



FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

**IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS FÁRMACOS Y DIANAS
CELULARES PARA EL TRATAMIENTO DE LA INFECCIÓN POR
EL VIRUS DE LA HEPATITIS C: CARACTERIZACIÓN DE
HIDROXICINA Y BENZTROPINA COMO INHIBIDORES DE LA
ENTRADA VIRAL Y DEL FACTOR CELULAR LPIN1 COMO
FACTOR LIMITANTE PARA LA INICIACIÓN DE LA
REPLICACIÓN DEL RNA VIRAL**

TESIS DOCTORAL

Lidia Mingorance Pérez

MADRID, Septiembre de 2015



FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

**IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS FÁRMACOS Y DIANAS
CELULARES PARA EL TRATAMIENTO DE LA INFECCIÓN POR
EL VIRUS DE LA HEPATITIS C: CARACTERIZACIÓN DE
HIDROXICINA Y BENZTROPINA COMO INHIBIDORES DE LA
ENTRADA VIRAL Y DEL FACTOR CELULAR LPIN1 COMO
FACTOR LIMITANTE PARA LA INICIACIÓN DE LA
REPLICACIÓN DEL RNA VIRAL**

Memoria presentada por la Licenciada en Biología D^a. Lidia Mingorance Pérez, adscrita al Departamento de Biología Molecular, para optar al grado de Doctor en Ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid.

El trabajo presentado en esta Tesis Doctoral ha sido realizado en el Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC) bajo la dirección del Dr. Pablo Gastaminza Landart y financiado por una beca Predoctoral JAE-Predoc del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Madrid, Septiembre de 2015



El trabajo presentado en esta Tesis Doctoral ha sido realizado en el Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC) bajo la dirección del Dr. Pablo Gastaminza Landart y financiado por una beca Predoctoral JAE-Predoc del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Madrid, Septiembre de 2015

Fdo. Pablo Gastaminza Landart

A MI FAMILIA

***“Si quieres resultados distintos, no hagas
siempre lo mismo”***

Albert Einstein

AGRADECIMIENTOS

Esta etapa que llega a su fin encierra momentos únicos e irrepetibles que implican a muchísima gente, tanto en el plano profesional como en el personal, sin la que llegar hasta aquí habría sido imposible. Para mí, cada uno de vosotros habéis ocupado un hueco irremplazable en mi vida y me habéis ayudado a avanzar y crecer cada día....Por ello, es complicado resumir en unas líneas todo lo que significáis para mí....GRACIAS A TODOS por formar parte de esta experiencia.

En primer lugar, quiero dar las gracias al BOSS, al **Dr. Gastaminza**, porque cuando yo andaba perdida y sólo buscaba un consejo, tú me diste la oportunidad de empezar una nueva etapa, continuar con mi formación científica y empezar el proyecto que ha resultado en esta Tesis. GRACIAS por confiar en mí. GRACIAS por todos los conocimientos que he adquirido formando parte de tu equipo, por todas las herramientas que has puesto a mi disposición para hacer que mi trabajo fuera el mejor posible, por tus consejos (a ratos de jefe y a ratos, de amigo), por “aguantarme” en las malas rachas y preocuparte cuando la cosa andaba mal, por tus “alegra esa cara y enseña esos piños”...

GRACIAS al **Dr. Ortín** por facilitar tanto las cosas y hacerlo siempre con una gran sonrisa. Infinitas gracias porque sin tu ayuda nada de esto habría sido posible. GRACIAS por tu amabilidad, por el trato que siempre me has dado, por hacerme sentir que yo era una más del grupo desde el primer día, por tus consejos....esos que cuando vienen desde la experiencia son los mejores que una puede recibir...

A la **Dra. Nieto**, la jefa...Porque eres una mujer de bandera, por ese humor tan tuyo que me resulta tremendamente gracioso, porque desde el primer día que hablé contigo allí, encerradas en tu despacho, me dí cuenta de que eres una persona única y de una valía incalculable, por tu cariño y tus bromas, porque no me puedo creer que después de tres años me preguntes si la lipina es una fosfatasa!!!!

GRACIAS a las chicas del CientoGastaminza. A **Martina**, por enseñarme tantas y tantas cosas (aprender de tí ha sido un lujo), por poner las cosas tan fáciles a la hora de trabajar y porque compartir tantos momentos de poyata y almuerzos contigo ha sido una experiencia increíble.... A **Claudia** porque, aunque no lo creas, tienes un humor muy peculiar que te arranca una sonrisa cuando menos te lo esperas, por tu inteligencia (tan grande que a veces asusta) y tu manera de ver las cosas....Porque tienes un enfoque científico que resulta tremendamente enriquecedor. A la nueva incorporación, **Victoria**, por tu alegría y tu sonrisa infinita...Porque tienes un positivismo que contagia y que ayuda sobremanera cuando las cosas se tuercen un poquito...Pertener a la misma familia (la de las lipinas) es todo un placer si se trata de compartir la experiencia contigo. A las compañeras que ya se fueron, **Chiara** y **Gema**, porque las charlas con vosotras a la hora de la comida ayudaban a liberar las tensiones de la rutina diaria con una carcajada.

A l@s compañer@s del 116 y 118 por todas las risas y experiencias compartidas tanto dentro como fuera del laboratorio, porque todos me habéis enseñado algo que me ha hecho crecer a nivel científico y personal. GRACIAS a **Sara**, **Lore** y **Noe**, porque con vosotras era imposible que el día empezara mal y porque si, aún así, algo se torcía remontar resultaba mucho más fácil, gracias por los consejos y vuestra alegría infinita...**Noe**, gracias por las charlitas pre y post-concierto; a **Rocío** y **Yolanda**, porque siempre habéis estado ahí para escuchar y ayudar en lo que habéis podido; a **Su**, porque siempre me hiciste sentir como en casa y tu frase “así no se escribe una tesis” era lo más; a

Joan, porque no creo que haya un compañero de poyata tan grande como tú y por tus chistes, esos que sólo te hacían gracia a tí pero que sabían sacar mi mejor sonrisa; a **Techu**, por ayudarme tantas veces con tus consejos y hacerlo sin ni siquiera yo pedirte; a **Paloma**, por tu naturalidad y simpatía, por el cariño demostrado a lo largo de los años y las conversaciones a destiempo en el baño; a **Lauri**, porque desde el primer momento (cuando aún las dos andábamos en el CNBito) me apoyaste en esta nueva andadura y me diste los ánimos que necesitaba cuando las cosas fueron complicadas, por tu positivismo y tu cariño; a **Ana**, por tu cercanía y profesionalidad; a **Jas**, porque eres tremendamente especial y siempre me sorprendes con tus bromas en mitad del pasillo, gracias por hacerme reír así; a **Ariel**, compañero en las derrotas del Barça pero también en las victorias del mister Guardiola; a **Ale** y **Pablo Chávez**, por estar siempre dispuestos a echar una mano.

GRACIAS a las chicas del 114, **Martina** y **Lucía**, porque con vosotras el ratito de la comida ha sido un bálsamo para olvidar las tensiones del día a día, por nuestras charlas en el pasillo y en el baño, por los partidos de fútbol, los bailes y las risas que nos hemos echado,...Porque, sobre todo en esta última fase, habéis sido una pieza clave para mantenerme arriba...INFINITAS GRACIAS....A **Martina**, en especial, GRACIAS por los mensajes de ánimo casi a diario y por nuestros ratitos de fin de semana para cargar las pilas y despejar la mente. A las nuevas incorporaciones, **Álex**, **Javi** (Paco) y **Cantón**, porque vuestra llegada fue un soplo de aire fresco y hacéis que las comidas sean un momento de paréntesis repleto de risas. A **Raúl**, por poner un poco de cordura en este grupo Hablar contigo es un auténtico placer. A los que ya se han ido, **Josema** y **JAR**, por todas las risas y momentos compartidos dentro y fuera del CNB. GRACIAS a **José** por su eterna sonrisa, su cariño infinito, sus buenos consejos y por estar siempre ahí....Tú fuiste la primera persona que conocí nada más llegar al CNB y, desde entonces, has formado parte de mi vida tanto dentro como fuera de él.

A **Fernando Almazán** por esa manera tan peculiar que tienes de hacerme reír a más no poder...

A **Ernesto** por estar al otro lado del pasillo pero siempre ahí, dispuesto a echar un cable, por tantas confidencias compartidas y enseñarme tantas cosas....Por ser casi como mi hermano pequeño, por toda la paz que me transmites cada vez que hablamos....Eres un super científico (aunque haya quien no lo valore)!!!!

GRACIAS a **Soco** y a **Inés** porque cada una, a vuestra manera, habéis sido como una madre para mí, por vuestros abrazos y palabras de ánimo que me han ayudado tanto a lo largo de estos años; a **Juan Carlos**, por el enorme cariño que me tienes y me demuestras a diarioGRACIAS por atiborrarme a perrunillas cada vez que bajo al almacén y hacer de padre en la distancia....Ni siquiera el de verdad se toma tan en serio mis cortes de pelo; a **Antonio**, por recibirme siempre con una sonrisa y preocuparte por cómo va el trabajo; a **Carol** y **Paloma**, por todas las risas y bromas compartidas que ayudan mucho más que un café y saben cómo “apañarte” el día...Vosotras sí que sabéis de Psicología...

GRACIAS a **todo el personal del CNB** que hace posible nuestro trabajo a diario.

Por último, tengo que agradecer esta Tesis a todas esas personas sin las que, a día de hoy, yo no sería lo que soy ni habría conseguido nada de lo que tengo en mi vida: mi familia y mis amigos.

GRACIAS a los **Mingorance Pérez**, por vuestra paciencia infinita más uno, por vuestro apoyo incondicional, por estar siempre ahí (y aquí, cuando ha sido necesario), por echarme tanto de menos

y quererme como sólo vosotros sabéis, por hacerme sentir especial a cada minuto y que valgo mucho más de lo que algunos me han hecho creer, por confiar tanto en mí y en que puedo con todo, por enseñarme que la vida es mucho más fácil cuando uno tiene mentalidad de equipo, porque juntos hemos formado el mejor, por respetar cada una de mis decisiones, apoyarlas y allanarme el camino aunque con ello cada vez estuviese más lejos de vosotros....A **mi madre**, porque eres un ejemplo de superación diaria, por tu enorme sensibilidad, por el corazón tan grande que tienes, por todo lo que vales (que es mucho más de lo que jamás podrías imaginar), por ser mi madre y mi amiga...Por estar las 24 horas del día, los 365 días del año...Por enseñarme que, aunque a veces la vida pueda resultar más complicada, dejarse llevar por lo que uno siente es la mejor manera de disfrutarla y que la felicidad está en las pequeñas cosas. A **mi padre**, porque eres todo eso a lo que aspiro llegar a ser en la vida....Mi mejor ejemplo de fuerza, valentía, tesón y constancia....Por enseñarme que las cosas si se hacen, se hacen bien y nada de a medias... Por esas llamadas que nunca haces pero que cuando llegan son las más reconfortantes...GRACIAS por mirarme como lo haces y darme esos abrazos que, cuando se trata de una despedida, parten el alma....Tenerte tan lejos creo que es de las peores cosas que siempre he llevado. A **mi hermano**, mi “Capitán Tapón”, porque eres mi TODO y aunque sé que lo sabes y eso, a veces, me hace tener las de perder...ME DA IGUAL... Porque siendo el pequeño siempre has hecho de hermano mayor. GRACIAS por tus consejos y por protegerme tanto, por hacerme reír a carcajada limpia en los momentos en que más lo he necesitado, por tus visitas relámpago para hacer más llevadera la distancia ...GRACIAS, en especial, por estos últimos meses...

A **mis abuelos**, mis segundos padres, porque donde quiera que sea que estéis siempre os he sentido a mi lado....GRACIAS por todo lo que me habéis dado y hacerme la nieta más feliz del mundo. Gran parte de todo lo que he conseguido en mi vida va dedicado a vosotros.

A **Niebla, Mia, Dina** y, sobre todo, a **Sultán** por todo el cariño que me habéis dado y enseñarme tanto sobre sentimientos.

A **mis tíos y mis primos**, por depositar en mí tanta confianza y ver más allá de los resultados inmediatos...A **mi tía Rosarito**, por ser un ejemplo de fuerza y optimismo...Porque, junto a mi padre, habéis sido responsables de que dedique mi tiempo a todo “esto” en lo que trabajo, y a **mi tío Gabriel**, por tener tan clara la solución al gran problema.

A los otros dos miembros del **trío La La La**, porque sois la mejor muestra de AMISTAD demostrada a cada segundo...Lo que unió el Reino Unido no lo han separado ni el Atlántico ni la Merkel...A **Myriam**, mi “best” ...THE BEST! Porque la palabra AMIGA contigo se queda pequeña y por ello, hablar de tí, es hablar de una hermana... Tú y yo sabemos lo que tenemos y, ay amiga, se trata de algo muy grande. GRACIAS por tus mensajes a diario y tus llamadas semanales para ver cómo anda todo...Porque, aunque a más de 2000 km, siempre te he sentido aquí...Ni en otros 14 años será posible devolverte todo lo que haces por mí...GRACIAS por quererme como soy y ver en mí todas esas cosas especiales que ves y que yo soy incapaz. A **Maribel**, mi peli, por alumbrarme con cada una de nuestras charlas, por esa manera tan especial y contagiosa que tienes de ver la vida y que te hace creer que todo es posible a pesar de las circunstancias, por tanta admiración demostrada....

A **Inés**, mi neni, por tratarme cómo lo has hecho (con ese cariño tan tremendo) desde el primer día en que nos conocimos, por estar ahí SIEMPRE...Porque has demostrado ser una amiga y considerarme una más de la familia....Porque el año pasado me concediste el regalo más bonito que podía imaginar.

A **mi Piluka** y a los **Arnáez Aguirre** por hacerme sentir siempre como una más de la familia y compartir conmigo momentos tan especiales. Eres mi media mandarina (you know) y lo mejor de mi paso por el 112. No sabes lo que vales pero ya estoy yo para decírtelo...GRACIAS por ser tan especial y enseñarme tantas cosas. Sigue en pie nuestro plan de repostería para un futuro cada vez más cercano.

A **Saripondio**, mi gordita...Es imposible expresar con palabras TODO lo que significas para mí...Una de mis mejores amigas, te has convertido en una pieza clave en mi vida...Es incalculable el valor de todo lo que recibo de tí cada día....GRACIAS por tu lealtad, sinceridad, tu enorme corazón, tu alegría infinita, tu nobleza, tu bondad, tus mensajes a deshoras, tantas “locuras” y secretos compartidos....GRACIAS por ser cómo eres y dejarme disfrutar de tí todo este tiempo....Por todo lo que nos queda por vivir juntas.

A **Silvi**, por todo lo que me has enseñado en estos 6 años y permanecer ahí después de tanto tiempo. Cuando te ví por primera vez, o mejor aún, cuando te oí hablar por primera vez (allá por el 2009), pensé....”esta chica promete”....y no me has defraudado. GRACIAS por hacerme sentir como en casa porque- contigo al lado- ANDALUCÍA está un poco más cerca. Gracias por ser tan auténtica y ponerle tanta pasión a cada cosa que haces.

A **María**, por cuidarme tanto y estar siempre al pie del cañón...Por ponerle tanta ilusión a esos planes que hacemos y que, al final, nunca cumplimos....Por contar conmigo para TODO e integrarme con tanto “ahínco” en tu grupo de amigos....ese que ahora también es el mío. Por tener la confianza suficiente de decirme siempre lo que piensas aunque sepas que no es lo que quiero escuchar....GRACIAS por todas las sorpresas que me has dado.

A **Patri**, la peque del grupo....Por tu apoyo incondicional, tus palabras de ánimo a cada instante y tu sinceridad, porque siempre estás ahí demostrándome un cariño infinito y regalándome consejos de valor incalculable....GRACIAS por “mojarte” como amiga para ayudarme tanto y por envidiarme en esas cosillas que tú y yo sabemos... esas que tú valoras tanto y que, para mí, pasan desapercibidas....

A **Naza**, compañera de toda una vida.....Por tener ese punto de locura que a mí me falta (aunque algunos opinen lo contrario), porque aburrirse contigo es imposible, por tus salidas y comentarios...Porque eres ÚNICA y porque “mira tú, pa que nos pegaríamos esas panzaicas de estudiar si, al final, hemos acabao tos en el mismo sitio???”...Qué GRANDE eres!!! GRACIAS por contar conmigo en “tu” día.

A **Anthony**, porque SIEEEEMPRE estás cuando se te necesita y eres tremendamente genial, por inventarte tantas rutas de montaña que-al final-nunca hicimos y contar conmigo para cada nueva idea que se te pasa por la mente cuando ando por allí abajo. GRACIAS por tenerme siempre “en lo más alto”.

A mi gente de Granada, todos **mis amigos de la facultad**, esos que me enseñaron tanto en una etapa sumamente especial de mi vida; en especial, a **Omar**, por tantas y tantas charlas compartidas en la escalinata de Ambientales, porque contigo los paseos por Granada adquirirían otra dimensión, por ser tan fiel y arroparme con cada uno de tus abrazos... siempre he tenido la sensación de que tú no puedes ser de este planeta...Eres un SUPER CRACK!!!

A **mi familia de Micro...**a **Pirri**, mi jefe, por enseñarme tanto de bacterias y de la vida, por todo el cariño que siempre recibí de ti; a **Rubén**, por esa mente tan genial que tienes y meterme siempre tanta caña...no sabes cuánto te he echado de menos!!!; y a **Platero**, porque tu seriedad en el trabajo siempre encerraba un humor peculiar....GRACIAS por tu paciencia y todo lo que aprendí de tí....Siempre has sido un referente para mí...Me regalásteis momentos únicos en mi formación científica y personal.

A **las piedras del camino**, por hacerme más fuerte y enseñarme que, en la vida, los tropiezos sacan lo mejor de tí; sin vosotras, gran parte de lo que hoy día tengo, no lo habría conseguido.

A **Salva**, por darme tanto y significarlo TODO...Porque eres de esas personas que llegan a la vida de uno para cambiarla por completo y hacerla más fácil, más bonita, mejor....Porque, a pesar de las circunstancias, sé que siempre estarás (como lo has hecho hasta ahora) ahí....Por ser así, simplemente, TÚ...GRACIAS por regalarme momentos irrepetibles, por creer en mí de esa manera y enseñarme a vivir con tanta intensidad...GRACIAS por todas esas cosas que no se pueden contar...Porque Equi + Hipo hay sólo uno y ese es el nuestro...Por enseñarme que IMPOSSIBLE IS NOTHING... Por ser ERMG.

Y, por último, quiero dar las GRACIAS a Super "H", **Hugo**, el enano de la familia....A tí te debo la fuerza y paciencia de la última etapa, has sido uno de los motores que me han hecho seguir adelante cuando el cansancio hacía de las tuyas, saberte tan cerquita ha sido una auténtica inyección de adrenalina...Verte y escucharte en vídeos o por Skype han sido una garantía de alegría y felicidad... GRACIAS por hacerme la tía con la sonrisa más grande del mundo cuando alguien habla o pregunta por tí. Eres un CAMPEÓN....tan pequeñito y tan valiente.

1. ÍNDICE

1.- ÍNDICE	1
2.- ABREVIATURAS	7
3.- SUMMARY	13
4.- RESUMEN	15
5.- INTRODUCCIÓN	17
11.- El virus de la hepatitis C (HCV): Epidemiología, patogénesis y variabilidad genética	17
12.- Tratamientos frente a la infección crónica por el virus de la hepatitis C.....	18
12.1.- Evolución de la terapia antiviral frente al virus de la hepatitis C	18
12.2.- Desarrollo de agentes antivirales directos (DAAs) y específicos frente al virus de la hepatitis C	19
12.3.- Desarrollo de agentes antivirales que actúan sobre dianas celulares (HTAs).....	20
13.- Biología molecular del virus de la hepatitis C.....	22
13.1.- Estructura y función de las proteínas de HCV	22
13.2.- Estructura del virión de HCV.....	25
13.3.- Ciclo de vida del virus de la hepatitis C y herramientas empleadas en su estudio	26
13.3.1.- La entrada de HCV depende del reconocimiento de proteínas virales y las apolipoproteínas celulares y colesterol asociados al virión	26
13.3.2.- La traducción del genoma viral depende de la autofagia y del miRNA-122.....	27
13.3.3.- La replicación del RNA viral tiene lugar en compartimentos membranosos y depende de las principales rutas de biosíntesis de lípidos.....	28
13.3.4.- Los viriones infecciosos se ensamblan en la interfaz del RE en un proceso que depende de gotas lipídicas (LDs) y elementos de la biosíntesis de lipoproteínas hepáticas	32
14.- Alteraciones del metabolismo de lípidos celular asociadas a la infección por HCV	34
15.- La familia de las lipinas como moduladores del metabolismo de lípidos y lipoproteínas de la célula	36
15.1.- Regulación de la expresión y actividad de LPIN1	37
15.2.- Funciones moleculares de las lipinas	38
15.2.1.- Función enzima fosfatasa de ácido fosfatídico (PAP).....	39
15.2.2.- Función transcripcional	40

6.- OBJETIVOS.....	41
7.- MATERIALES Y MÉTODOS	43
M1.- Líneas celulares humanas	43
M1.1.- Cultivo de líneas celulares	43
M2.- Virus.....	44
M2.1.- Virus recombinantes de hepatitis C	44
M2.2.- Producción de stocks de virus.....	45
M2.2.1.- Producción de virus infecciosos a partir de cDNA.....	45
M2.2.2.- Preparación de moldes de DNA y transcripción <i>in vitro</i> de genomas virales recombinantes.....	45
M2.2.3.- Electroporación	47
M2.2.4.- Titulación mediante dilución límite, inmunofluorescencia y recuento de focos de infección	48
M2.2.5.- Producción de stocks de virus por propagación de virus infeccioso	49
M2.3.- Ensayos de infección con el virus de la hepatitis C	50
M2.3.1.- Infección de ciclo único.....	50
M2.3.2.- Infección de ciclo múltiple para evaluación de compuestos antivirales	51
M2.3.2.1.- Infección con la cepa TNcc del genotipo 1a	51
M2.3.3.- Infección persistente.....	51
M2.4.- Coronavirus humano 229E-GFP	52
M2.4.1.- Generación de stocks del coronavirus humano 229E-GFP	52
M2.4.2.- Infección y producción de virus progenie por el coronavirus humano 229E-GFP	53
M2.4.3.- Titulación del coronavirus humano 229E-GFP mediante dilución límite, inmunofluorescencia y recuento de focos de infección	53
M3.- Ensayos de replicación transitoria por transfección de RNAs virales subgenómicos	53
M4.- Partículas transcomplementadas de hepatitis C (HCV_{TCPs})	54
M5.- Vectores retrovirales	55
M5.1.- Partículas pseudotipadas.....	55

M5.2.- Vectores lentivirales para la expresión de silenciadores (shRNAs).....	56
M6.- Medida de actividad luciferasa	57
M7.- Bacterias.....	57
M7.1.- Cepa y cultivo de bacterias	57
M7.2.- Transformación de bacterias competentes mediante choque térmico y amplificación de cultivos bacterianos	58
M8.- Manipulación y análisis de DNA	58
M8.1.- Plásmidos	58
M8.2.- Electroforesis de DNA en geles de agarosa	58
M9.- Manipulación y análisis de RNA	58
M9.1.- Extracción y purificación de RNA.....	58
M9.2.- Análisis de RNA mediante transcripción reversa y PCR cuantitativa (RT-qPCR)	59
M10.- Inmunodetección de proteínas mediante Western Blot	60
M11.- Estudios de silenciamiento génico. Generación de líneas celulares deficientes en la expresión de la proteína celular LPIN1 mediante transducción lentiviral	61
M12.- Estudio de la proliferación y viabilidad celular	62
M12.1.- Estudio de proliferación celular (biomasa) mediante tinción con cristal violeta.....	62
M12.2.- Análisis de la viabilidad celular mediante ensayo de MTT	62
M13.- Rastreo de una colección de compuestos químicos	63
M13.1.- Identificación de compuestos con actividad antiviral mediante un ensayo de ELISA.....	63
M13.2.- Discriminación entre compuestos tóxicos y antivirales: identificación de falsos-positivos	63
M13.3.- Compuestos químicos	64
M13.4.- Determinación de los índices de potencia (EC_{50}) y toxicidad (CC_{50})	64
M13.5.- Ensayos de “tiempo de adición”	64
M14.- Análisis estadístico.....	65
8.- RESULTADOS.....	67
R1.- Identificación de compuestos inhibidores de la infección por el virus de la hepatitis C	67

R1.1.- Rastreo de una quimioteca de fármacos de uso clínico para la identificación de nuevos inhibidores de la infección por el virus de la hepatitis C.....	67
R1.2.- Cálculo de la concentración efectiva y del índice terapéutico de los compuestos seleccionados	70
R1.3.- Los compuestos seleccionados inhiben aspectos tempranos de la infección por HCV	72
R1.4.- Análisis del impacto de los inhibidores seleccionados sobre la infección persistente por el virus de la hepatitis C	74
R1.5.- Los compuestos seleccionados inhiben la entrada de varios genotipos del virus de la hepatitis C	75
R1.6.- La entrada de la cepa JFH-1 de HCV, genotipo 2a, en la célula hospedadora es especialmente susceptible a la actividad antiviral de hidroxicina.....	77
R1.7.- La infección con la cepa JFH-1 de HCV está bloqueada en un paso posterior a la adsorción del virus a la célula hospedadora.....	78
R2.- Caracterización de un factor celular implicado en la regulación del metabolismo de glicero- y fosfolípidos (LPIN1) durante la infección por el virus de la hepatitis C	79
R2.1.- La infección por el virus de la hepatitis C interfiere en la regulación de la expresión de LPIN1	80
R2.2.- Caracterización del silenciamiento de LPIN1 en células de hepatoma humano (Huh-7).....	81
R2.3.- Papel del factor celular LPIN1 en la infección por el virus de la hepatitis C	83
R2.4.- La infección con HCV _{TCPS} se ve afectada por el silenciamiento de LPIN1	85
R2.5.- El efecto del silenciamiento de LPIN1 en la infección por HCV no es genotipo- dependiente.....	86
R2.6.- LPIN1 no es limitante para la infección por el coronavirus humano 229E-GFP	88
R2.7.- Los niveles celulares de LPIN1 no son limitantes para la infección persistente por el virus de la hepatitis C	90
R2.8.- Estudio del papel de LPIN1 en aspectos tempranos de la infección por HCV.....	92
R2.8.1.- Los niveles celulares de LPIN1 no son limitantes para la entrada viral.....	92
R2.8.2.- El silenciamiento de LPIN1 afecta a la replicación del genoma viral sin alterar la traducción primaria	93
9.- DISCUSIÓN	97
D1.- Rastreo de compuestos químicos con actividad antiviral frente al virus de la hepatitis C	97

D2.- Identificación de LPIN1 como diana celular frente a la infección por el virus de la hepatitis C.....	102
10.- CONCLUSIONES	111
11.- BIBLIOGRAFÍA	113
12.- ANEXOS	143

2. ABREVIATURAS

α 1AT	alfa 1 antitripsina
aa	Aminoácidos
AANE	Aminoácidos no esenciales
Acm	Anticuerpo monoclonal
Acp	Anticuerpo policlonal
apoAI	Apolipoproteína AI
apoB	Apolipoproteína B
apoCIII	Apolipoproteína CIII
apoE	Apolipoproteína E
ARFP	Proteína generada a partir de un marco de lectura alternativo (del inglés, Alternative Reading Frame Protein)
ATG12	Proteína 12 asociada a autofagia
ATG4B	Cisteín proteasa 4B asociada a autofagia
ATG5	Proteína 5 asociada a autofagia
ATG8	Proteína 8 asociada a autofagia
BA	2-cloro-5-nitro-N-(piridil)-benzamida
BSA	Albúmina de suero bovino
C-LIP	Extremo carboxi terminal (lipina)
C-terminal	Extremo carboxi terminal
CAD	Fármaco anfifílico catiónico (Cationic Amphiphilic Drug)
CC ₅₀	Concentración citotóxica 50%
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CKII α	Caseín quinasa II alfa
cLD	Gota lipídica citosólica
CLDN1	Claudina-1
Con1C3-JFH1	Virus quimérico de hepatitis C (genotipo 1b) (sección M2.1)
CoV	Coronavirus
CPT1 α	Carnitina palmitoiltransferasa 1a
CRE	Compartimento de reciclaje endocítico
Ct	Ciclo umbral
Ctrl	Control
CypA	Ciclofilina A
D183v	Virus adaptado a cultivo celular derivado del virus JFH-1 (genotipo 2a del virus de la hepatitis C) (sección M2.1)
DAA	Antiviral de acción directa
DAG	Diacilglicerol
DAPI	4,6-diamino-2-fenilindol
DEPC	Dietilpirocarbonato
DGAT1	Diacilglicerol aciltransferasa-1
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco

DMEMc	Medio Eagle modificado por Dulbecco completo (sección M1.1)
DMSO	Dimetil sulfóxido
DMV	Vesícula de doble membrana
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DNAsa	Desoxirribonucleasa
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
DTT	1,4-Ditiotreitol
DXDXT	Motivo catalítico con actividad fosfatasa de ácido fosfatídico de las lipinas
EC ₅₀	Concentración inhibitoria 50%
EC ₉₀	Concentración inhibitoria 90%
ECMV	Virus de la encefalomiocarditis
EDTA	Ácido etiléndiaminotetraacético
EGTA	Ácido etiléngliceroltetraacético
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
ER α	Receptor alfa de estrógenos
Exo 3'-5'	Exonucleasa 3'-5'
F	Proteína F (del inglés, F rameshift P rotein)
FAS	Enzima sintasa de ácidos grasos
ffu	Unidad formadora de focos (<i>forming focus unit</i>)
FLU	Virus de la gripe
FVR	Factoría viral de replicación
g	gramo
GAGs	Glicosaminoglicanos
GAPDH	Gliceraldehído fosfato 3-deshidrogenasa
GFP	Proteína verde fluorescente
GPx8	Glutación peroxidasa 8
GTC	Isotiocianato de guanidinio
HA	Hemaglutinina
HBS	Tampón salino con HEPES
HCV	Virus de la hepatitis C
HCV _{pp}	Partícula retroviral pseudotipada de HCV (sección M5.1)
HCV _{TCP}	Partícula transcomplementada de HCV (sección M4)
HEK293T	Línea celular de riñón embrionario humano (sección M1)
HEPES	Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónido
HFN4- α	Factor nuclear 4 alfa de hepatocito
HIV-I	Virus de la Inmunodeficiencia Humana-I
hpe	horas post-electroporación
hpi	horas post-infección
hpt	horas post-transfección

HRP	Peroxidasa del rábano picante
HTA	Agente dirigido frente a un factor celular
Huh-7	Línea celular de hepatoma humano (sección M1)
Huh-7.5	Clon celular derivado de la línea celular Huh-7 (sección M1)
Huh-7.5.1 clon-2	Clon celular derivado de un subclón Huh-7.5.1 de la línea celular Huh-7.5 (sección M1)
Huh-7.5.1c2	Equivale a Huh-7.5.1 clon-2
Huh-7.5.1c2i	Línea celular Huh-7.5.1 clon-2 infectada con el virus de la hepatitis C
Huh-7i	Línea celular Huh-7 infectada con el virus de la hepatitis C
HVR-I	Región hipervariable I
HVR-II	Región hipervariable II
H77C3-JFH1	Virus quimérico de hepatitis C (genotipo 1a) (sección M2.1)
IF	Inmunofluorescencia
IFN	Interferón
IgG	Inmunoglobulina G
IRES	Sitio interno de unión al ribosoma
IRRDR	Región determinante de la resistencia a interferón y ribavirina
ISDR	Región determinante de la sensibilidad a interferón
I.T.	Índice terapéutico
IVT	Producto de transcripción <i>in vitro</i>
JFH-1	Virus recombinante adaptado a cultivo celular derivado del clon infeccioso Japanese Fulminant Hepatitis-1 (genotipo 2a del virus de la hepatitis C) (sección M2.1)
kDa	kilodalton
kV	kilovoltios
l	litro
LB	Luria-Bertani
LC3	Cadena ligera 3 de la proteína 1 asociada al microtúbulo
LD	Gota lipídica (del inglés, Lipid Droplet)
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LPIN1	Lipina-1
LPIN1low	Línea celular Huh-7 que expresa niveles reducidos de LPIN1 (sección R2.2)
LPIN1med	Línea celular Huh-7 que expresa niveles intermedios de LPIN1 (sección R2.2)
LPIN1 α	Isoforma alfa de Lipina-1
LPIN1 β	Isoforma beta de Lipina-1
LPIN1 γ	Isoforma gamma de Lipina-1
LPIN2	Lipina-2
LPIN3	Lipina-3

LVP	Lipoviropartícula
LXXIL	Motivo con actividad transcripcional de las lipinas
M	Molar (molaridad)
mA	miliamperios
MAVS	Adaptador mitocondrial de señalización antiviral
MDI	Multiplicidad de infección
min	minuto/s
miRNA-122	microRNA-122
ml	mililitro
MLV	Virus de la leucemia murina
mM	milimolar
mRNA	RNA mensajero
mTOR	Diana de rapamicina en mamíferos (del inglés, Mammalian Target Of Rapamicin)
mTORC1	Complejo 1 de mTOR (del inglés, Mammalian Target Of Rapamicin Complex 1)
MTP	Proteína transportadora de triglicéridos microsomales
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
Mw	Multipocillo
N-LIP	Extremo amino terminal (lipina)
N-terminal	Extremo amino terminal
n.s.	no significativo
NA	Neuraminidasa
NCC_ID	Identificador en Pubmed de la estructura de un compuesto químico
NFATc4	Factor nuclear de linfocitos T activados, citoplásmico 4 (del inglés, Nuclear Factor of Activated T-cell, cytoplasmic 4)
ng	nanogramo
NIH	National Institutes of Health
NLS	Señal de localización nuclear
nm	nanómetros
NPC1L1	Receptor de colesterol (del inglés, Niemann-Pick C1-Like 1)
NS	Proteína no estructural
nt	Nucleótido
NTPasa	Nucleósido trifosfatasa
OCLN	Ocludina
OD ₄₅₀	Densidad óptica a 450 nm
ORF	Marco abierto de lectura
OSBP	Proteína de unión a oxisterol
PA	Ácido fosfatídico
PAP	Fosfatasa de ácido fosfatídico

pb	Pares de bases
PBS	Tampón salino con fosfato
PC	Fosfatidilcolina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PE	Fosfatidiletanolamina
PEG-IFN α	Interferón alfa pegilado
PGC-1 α	Coactivador 1 alfa del receptor gamma activado por proliferadores de peroxisomas
PI-4,5-P ₂	Fosfatidil-inositol 4-5-bifosfato
PI4K-III α	Fosfatidilinositol 4-quinasa III alfa
PIP4	Fosfatidilinositol 4 fosfato
PKD-Vps 34	Complejo formado por la proteína quinasa D (PKD) y la fosfatidilinositol-3-quinasa (Vps34)
PLA2	Fosfolipasa A2
PMID	Identificador en Pubmed de una publicación
PPAR α	Receptor alfa activado por proliferadores de peroxisomas
PSTPIP2	Proteína 2 de interacción con prolina-serina-treonina fosfatasas
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RD114	Glicoproteína del retrovirus endógeno felino
RdRp	RNA polimerasa dependiente de RNA
RE	Retículo endoplásmico
RIG-I	Gen I inducible por ácido retinoico
RNA	Ácido ribonucleico
RNAi	Interferencia de RNA /RNA interferente
RNAse	Ribonucleasa
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Transcripción reversa
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa acoplada a transcripción reversa
RT-qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa acoplada a transcripción reversa
RxR α	Receptor X retinoide alfa
S1R	Receptor Sigma 1
SBF	Suero bovino fetal
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida y SDS
SERMs	Moduladores sintéticos del receptor de estrógenos
SGR	Replicón subgenómico
shRNA	RNA pequeño en horquilla (del inglés, small hairpin RNA)

siRNA	RNA pequeño interferente (del inglés, s mall i nterfering R NA)
SR-BI	Receptor scavenger clase B tipo I
SREBP	Proteína de unión al elemento de respuesta a esteroides
T162	Botella de 162 cm ² para el cultivo de células
T75	Botella de 75 cm ² para el cultivo de células
TA	Temperatura ambiente
TAG	Triglicérido
TBS	Tampón salino con Tris-clorhídrico
Terapia PR	Terapia antiviral basada en el uso combinado de interferón alfa pegilado y ribavirina
T _m	Temperatura de fusión
TNcc	Virus recombinante adaptado a cultivo celular derivado del clon HC-TN del virus de la hepatitis C (genotipo 1a)
TNE	Tampón Tris-cloruro sódico-EDTA
TRIF	Activador de interferón asociado al receptor Toll
UTR	Región no traducida
V	Voltios
VAMP	Proteína de membrana asociada a vesícula
VAPA	Proteína A asociada a VAMP
VAPB	Proteína B asociada a VAMP
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad
VSV	Virus de la estomatitis vesicular
VSV _{pp}	Partícula pseudotipada del virus de la estomatitis vesicular (sección M5.1)
WB	Western Blot
XBP-1	Proteína 1 de unión a la X-box
XRN1	5'-3' exoribonucleasa 1
μF	microfaradio
μg	microgramo
μl	microlitro
μM	micromolar
%GC	Contenido en guanina y citosina
2mAde	2-C-metiladenosina

3. SUMMARY

Hepatitis C virus (HCV) is a major cause of severe liver disease and it remains a significant health burden worldwide with an estimated 170 million people chronically infected. The hepatitis C viruses exhibit a high genetic variability. They are grouped into 7 major genotypes and more than 80 subtypes and circulate as quasispecies within a given infected individual. Novel treatment regimens combining different direct acting antivirals (DAAs) efficiently inhibit hepatitis C virus infection. However, they have limited availability and cost considerations. Moreover, and despite promising data in clinical trials, the potential selection for HCV resistant variants may limit their efficacy when facing such a diverse constellation of virus variants in the field. Alternative or complementary approaches offering pangenotypic antiviral activity and controlling the potential expansion of drug-escape mutants are needed. The discovery or the development of new drugs targeting host factors involved in hepatitis C virus replication provide an interesting perspective for novel antiviral strategies. By acting through a complementary mechanism of action, host-targeting agents (HTAs) may synergistically act with DAAs to increase the genetic barrier to resistance and develop a broad pangenotypic activity. Additionally, hepatitis C virus co-opts/hijacks host lipid and lipoproteins metabolism to enhance virus multiplication. As a consequence, alterations in lipid homeostasis take place that manifest as the pathological basis for some of HCV-associated maladies. Targeting of components of host lipid metabolic pathways holds promise as an effective anti-HCV therapeutic strategy as it could help to revert HCV-infection associated pathogenesis. In the present work we propose two different strategies to identify new antiviral candidates against hepatitis C virus infection.

The first strategy is based on the identification and evaluation of new antivirals that could be effective components of combination therapies against HCV. In order to contribute to this task, we used an unbiased screening cell culture assay to interrogate a chemical library of compounds approved for clinical use in humans. This system, that reproduces the entire virus lifecycle in a miniaturized setting, enables identifying nontoxic antiviral compounds potentially targeting any aspect of the viral lifecycle, be the target viral or cellular. We identified two novel HCV antivirals, hydroxyzine and benztropine, that have a high therapeutic window in cell culture and inhibit HCV infection by different genotypes in various hepatoma cell lines at clinically achievable doses. These compounds are selective inhibitors of HCV entry in cell culture at a post-adsorption step.

The second strategy is based on the identification and characterization of the functional role of a potential host target gene, *LPIN1*, in HCV infection. In order to accomplish this aim, we downregulated LPIN1 protein expression by silencing its mRNA expression using RNAi in a human hepatoma cell line. By using surrogate models for different aspects of hepatitis C virus infection, we determined that cellular levels of LPIN1 protein are limiting for HCV infection independently of the viral genotype, at the level of initiation of HCV replication without affecting primary translation. However, LPIN1 downregulation does not interfere with persistent HCV infection. LPIN1 role on HCV replication appears to be specific, as another positive single-stranded RNA virus infection, human coronavirus 229E-GFP, is not limited by LPIN1 downregulation. Additionally, we observed an induction of LPIN1 mRNA and protein expression levels during HCV infection suggesting that viral infection could interfere with regulation of LPIN1 expression and hypothetically activity and consequently with cellular lipid homeostasis. These results indicate that LPIN1 is an essential host

Summary

factor for HCV replication and holds promise for the development of new antivirals targeting its function to inhibit HCV infection while potentially reverting certain aspects of HCV-associated pathogenesis.

4. RESUMEN

El virus de la hepatitis C (HCV) es la principal causa mundial de enfermedad hepática grave y representa un problema biomédico importante con cerca de 170 millones de individuos crónicamente infectados en todo el mundo. Los virus de la hepatitis C presentan una elevada variabilidad genética con 7 genotipos mayoritarios y más de 80 subtipos exhibiendo, además, una dinámica de cuasiespecies en cada paciente. Aunque existen terapias basadas en el uso combinado de agentes antivirales directos (DAAs) que inhiben eficientemente la infección por HCV, su elevado coste, una eficacia limitada a unos cuantos genotipos virales y la aparición de variantes resistentes dificultan, en muchos casos, su implantación. Nuevas estrategias terapéuticas que ofrezcan una actividad pangenotípica y ayuden a contener la expansión de mutantes resistentes son necesarias. En este sentido, la identificación o el diseño de fármacos frente a factores celulares (HTAs) con un papel esencial en el ciclo replicativo de HCV cobra especial importancia ya que, al presentar mecanismos de acción complementarios a los DAAs, éstos podrían actuar de manera sinérgica ofreciendo una barrera genética elevada al desarrollo de resistencias y cubriendo, potencialmente, un mayor número de genotipos. HCV explota diferentes componentes del metabolismo de lípidos y lipoproteínas celular para una replicación más eficiente; ello induce importantes cambios en la homeostasis lipídica de la célula que se traducen en la aparición de patologías graves. La identificación de proteínas celulares con un papel central en dicho metabolismo y la actuación sobre ellas ayudaría revertir la patogénesis asociada a la infección por HCV así como al diseño de nuevos fármacos frente a la misma. En este trabajo se presentan dos estrategias diferentes para el desarrollo de nuevas terapias antivirales frente a la infección por HCV.

La primera estrategia se basa en la identificación y evaluación de nuevos antivirales que podrían emplearse en terapia combinada frente a la infección por HCV. Empleando un sistema de infección no sesgado y miniaturizado que reproduce el ciclo replicativo completo del virus y permite el análisis simultáneo de cientos de moléculas con potencial para inhibir cualquier aspecto del ciclo infectivo de HCV, ya sea su diana tanto celular como viral, identificamos dos compuestos autorizados para uso clínico, benzotropina e hidroxicina, que presentan una amplia ventana terapéutica e inhiben la infección por distintos genotipos de HCV en diferentes líneas celulares de hepatoma humano. Ambos compuestos inhiben específicamente la entrada de HCV actuando en un paso posterior a la adsorción del virus a la célula hospedadora.

La segunda estrategia se basa en la identificación y caracterización del papel funcional de la proteína LPIN1 en la infección por HCV. Mediante RNAi silenciamos la expresión de LPIN1 en líneas celulares de hepatoma humano empleando dos shRNAs diferentes. Usando modelos sustitutivos de diferentes aspectos de la infección con HCV comprobamos que los niveles celulares de LPIN1 son limitantes para el establecimiento y/o funcionamiento de los complejos de replicación del virus una vez traducidos los genomas entrantes y con independencia del genotipo viral considerado. No obstante, parecen dispensables en el contexto de una infección persistente. LPIN1 tiene un papel específico sobre la replicación de HCV ya que su silenciamiento no resulta limitante para la infección por otro virus RNA de cadena sencilla y polaridad positiva, como el coronavirus humano 229E-GFP. Alternativamente, observamos una inducción en los niveles de RNA mensajero y proteína de LPIN1 durante la infección por HCV que sugiere que dicha infección podría interferir en la regulación de la expresión de LPIN1 y, por lo tanto, con la homeostasis de lípidos. LPIN1 se presenta así como un

factor celular esencial en la replicación de HCV y plantea la posibilidad de desarrollar fármacos dirigidos frente a su función que ayudarían a inhibir la infección por HCV y revertir la patogénesis asociada a la misma.

5. INTRODUCCIÓN

11.- El virus de la hepatitis C (HCV): Epidemiología, patogénesis y variabilidad genética

El virus de la hepatitis C (HCV) es un virus hepatotrópico que infecta exclusivamente a humanos y constituye la primera causa mundial de enfermedad hepática grave. En la actualidad, representa un problema biomédico importante con cerca de 170 millones de individuos infectados en todo el mundo y entre 3 y 4 millones de casos nuevos registrados cada año (Mohd Hanafiah y col., 2013). Aunque la infección por HCV se resuelve de manera espontánea en un 15-45% de los pacientes infectados, la mayoría acaban desarrollando una infección persistente gracias, en parte, a la evasión del sistema inmunitario (Alter 1999; Conry-Cantilena y col., 1996). Los pacientes infectados de manera crónica presentan un mayor riesgo de desarrollar fibrosis, cirrosis y hepatocarcinoma celular (Yamane y col., 2013); patologías que constituyen la principal causa de trasplante hepático a nivel mundial y que suponen un elevado gasto económico (Lavanchy 2009).

La infección por HCV evoluciona de manera asintomática hacia su fase crónica (Racanelli y Rehermann 2003; Yamane y col., 2013). Además, dado el elevado coste de su diagnóstico que supone el análisis en sangre de la presencia de anticuerpos frente al virus y la determinación de la carga viral, mediante amplificación del RNA de HCV, éste no se realiza de rutina, por lo que gran parte de los individuos infectados desconocen que lo están (Li y Lo 2015; Irshad, Mankotia, y Irshad 2013). Así, la infección por HCV pasa desapercibida entre la población dificultando su acceso a un tratamiento efectivo y promoviendo su expansión sin control (Li y Lo 2015; Irshad,

Mankotia, y Irshad 2013; Racanelli y Rehermann 2003). Este conjunto de circunstancias ha dado a la infección por HCV el calificativo de epidemia silente (Racanelli y Rehermann 2003). Identificar a la población infectada y evitar la progresión de la infección hacia su fase crónica se convierte en una prioridad a nivel epidemiológico (Li y Lo 2015).

Identificado en 1989 a partir de suero de un paciente con hepatitis no-A, no-B (Choo y col., 1989), el HCV se propaga a través del contacto directo con sangre contaminada. Este hecho hace que un gran número de pacientes adquiriesen la infección por transfusión de sangre contaminada antes de que se implementasen los test diagnósticos para HCV en 1990 (Jacobson y col., 2010). Actualmente, el consumo de drogas por vía intravenosa se convierte en la causa más frecuente de transmisión en los países desarrollados (Nelson y col., 2011) y sólo un pequeño porcentaje de los nuevos casos que se registran se deben a infecciones nosocomiales (Hatia y col., 2015), prácticas sexuales de riesgo (Bradshaw, Matthews, y Danta 2013), transmisión perinatal o determinadas prácticas culturales (tatuajes, piercings, acupuntura,...).

Los virus de la hepatitis C presentan una elevada variabilidad genética debido, principalmente, a su alta tasa replicativa (se estima que la producción y eliminación de partículas virales es aproximadamente 10^{12} partículas virales por persona y día), a una alta tasa de error debida a la falta de una actividad correctora de pruebas en su RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) y a la ausencia de actividades de corrección de errores post-replicativos en el RNA (Neumann y col., 1998; Behrens, Tomei, y De Francesco 1996; Domingo, Sheldon, y Perales 2012;

Steinhauer, Domingo, y Holland 1992). En cada individuo infectado, HCV se presenta como una población de genomas divergentes, aunque próximamente relacionados, que muestran una distribución que sigue un modelo de cuasiespecies (Gomez y col., 1999). Los aislados de HCV se clasifican en genotipos y subtipos atendiendo a la secuencia génica de la región 5'-UTR (región no traducida) y de las proteínas core y NS5B (Yu y col., 2013). Se han descrito 7 genotipos mayoritarios y múltiples subtipos. Genotipos y subtipos difieren en su secuencia nucleotídica un 33% y 25%, respectivamente (Simmonds 2013; Scheel y Rice 2013). Existen diferencias en cuanto a la distribución geográfica y prevalencia de los distintos genotipos siendo el genotipo 1 el más prevalente a nivel mundial, seguido de los genotipos 2 y 3 (Li y Lo 2015; Bartenschlager, Lohmann, y Penin 2013; Scheel y Rice 2013). Además, el curso natural de la infección difiere en función del genotipo con consecuencias sobre la patogénesis y respuesta a la terapia antiviral (Li y Lo 2015; Scheel y Rice 2013).

Aunque se desconocen los detalles moleculares que subyacen a la patogénesis de HCV, una respuesta inmunológica prolongada e ineficaz frente al virus así como un impacto directo de la replicación viral sobre el metabolismo celular son los principales responsables de la destrucción progresiva del parénquima hepático y su evolución hacia un fenotipo/estado fibrótico y/o cirrótico observado en algunos pacientes crónicos (Alter 1999; Racanelli y Rehermann 2003). La infección crónica por HCV también se caracteriza por una acumulación anormal de triglicéridos en los hepatocitos (esteatosis hepática) habiéndose observado una buena correlación entre el nivel de esteatosis y la

replicación de HCV en individuos infectados con el genotipo 3 (Adinolfi, Restivo, y Marrone 2013; Abid y col., 2005; Negro y Sanyal 2009). Se propone que el control del metabolismo celular por parte del virus (Vasallo y Gastaminza 2015) así como la existencia de una población de cuasiespecies en constante evolución dentro de un mismo individuo podrían explicar la persistencia de la infección y su contribución a la patogénesis viral (Racanelli y Rehermann 2003; Irshad, Mankotia, y Irshad 2013). Actualmente, no existe ninguna vacuna preventiva frente a la infección por HCV y los tratamientos disponibles son sólo parcialmente efectivos. Sin embargo, la eficacia mostrada por las nuevas terapias que incluyen agentes antivirales directos (DAAs) proporcionan una perspectiva optimista en la lucha contra la infección por HCV (Vasallo y Gastaminza 2015).

12.- Tratamientos frente a la infección crónica por el virus de la hepatitis C

12.1.- Evolución de la terapia antiviral frente al virus de la hepatitis C

Desde la introducción de la monoterapia basada en interferón alfa (IFN- α) en 1992 hasta la aprobación de la primera generación de inhibidores de la proteasa viral (DAAs), telaprevir o boceprevir, en uso combinado con la terapia a base de interferón- α pegilado (PEG-IFN- α) y ribavirina (terapia PR) en 2011, la tasa de curación de los pacientes infectados con el genotipo 1 se ha incrementado desde menos del 10% hasta un 70-80% (Lange y col., 2014).

El establecimiento de modelos de infección en cultivo celular que recapitulan

aspectos parciales del ciclo replicativo de HCV (sistema del replicón, HCV_{PP} o HCV_{TCP}) (Lohmann y col., 1999; Bartosch, Dubuisson, y Cosset 2003; Steinmann y col., 2008) o que se basan en clones moleculares infecciosos (Zhong y col., 2005) y la determinación de la estructura tridimensional de las proteínas virales (Bartenschlager, Lohmann, y Penin 2013) han permitido un conocimiento más exhaustivo acerca del ciclo vital de HCV y, con ello, de los diferentes factores celulares y virales requeridos para la replicación eficiente del virus. Ello ha favorecido el desarrollo de DAAs que actúan de manera específica sobre diferentes proteínas o estructuras RNA del virus (Lange y Zeuzem 2013) y la identificación de factores celulares, ciclofilina A (CypA) o microRNA miRNA-122, que pueden ser empleados como dianas de agentes antivirales (HTAs) (Lange y col., 2014).

A pesar de acortar la duración de los tratamientos e incrementar la tasa de cura de los pacientes tratados, la inclusión de los DAAs de primera generación a las terapias basadas en IFN- α estuvo asociada con la aparición de efectos adversos severos, el desarrollo de resistencias e incompatibilidad con otros fármacos. Estas limitaciones se superaron, en parte, con el desarrollo de nuevos DAAs dirigidos no sólo frente a la proteasa viral (NS3-4A) sino también frente a la polimerasa (NS5B) y la proteína NS5A y con la aparición de terapias cuádruples que combinaban dos DAAs de acción y perfil de resistencia antiviral distinto con la terapia PR (Lange y col., 2014).

Rápidamente se demostró que la inclusión de sofosbuvir (DAA) en terapia combinada con ribavirina permitiría abandonar el uso de IFN, reduciendo tanto la duración como los efectos adversos asociados al tratamiento (Lawitz y col., 2013; Jacobson y

col., 2013; Zeuzem y col., 2014).

Así, en octubre de 2014, se aprobó el empleo de la primera terapia libre de IFN (Harvoni) para el tratamiento de la infección crónica por el genotipo 1 que se basa en el uso combinado de ledispavir y sofosbuvir y se asocia con una tasa de cura del 95-100% en ensayos clínicos (Pawlotsky y col., 2015; Li y Lo 2015). Finalmente, a comienzos de 2015, se aprobó el uso de una terapia triple que combina inhibidores de la proteasa viral (paritaprevir), de la proteína NS5A (ombitasvir) y de la polimerasa NS5B (dasabuvir) con ritonavir, un inhibidor de la proteasa de HIV-I. Esta terapia se asocia con una tasa de cura próxima al 100% en ensayos clínicos con pacientes infectados por el genotipo 1 de HCV (Pawlotsky y col., 2015).

12.2.- Desarrollo de agentes antivirales directos (DAAs) y específicos frente al virus de la hepatitis C

Existen tres tipos de DAAs aprobados para su uso en clínica: inhibidores de la proteasa viral (NS3-4A), inhibidores de la polimerasa (NS5B) e inhibidores de la proteína NS5A (Pawlotsky y col., 2015).

Inhibidores de la proteasa NS3-4A.

Interfieren en la unión de la proteasa a su sustrato impidiendo el correcto procesamiento de la poliproteína del virus (Pawlotsky y col., 2015; Lange y col., 2014). Dado que la actividad proteasa de NS3-4A también está implicada en contrarrestar la respuesta innata frente a HCV (Bartenschlager, Lohmann, y Penin 2013), es posible que el empleo de estos inhibidores ayude a reactivar dicha respuesta en la célula

infectada.

La primera oleada de inhibidores de primera generación, telaprevir y boceprevir, mostró una eficacia limitada al genotipo 1, una barrera genética muy pequeña al desarrollo de resistencias y numerosos efectos adversos asociados. La segunda oleada de inhibidores aumentó su cobertura genotípica ya que mostró su eficacia frente a los genotipos 1, 2 y 4. Sin embargo, hubo que esperar a la segunda generación de inhibidores de la proteasa (asunaprevir o simeprevir) para conseguir una barrera genética elevada frente al desarrollo de resistencias, una mayor tolerabilidad y una actividad pangenotípica (Pawlotsky y col., 2015; Lange y col., 2014; Scheel y Rice 2013; Bartenschlager, Lohmann, y Penin 2013).

Inhibidores de la polimerasa NS5B. Se clasifican en dos categorías atendiendo a su estructura química. Los **inhibidores análogos de nucleós(t)idos** se unen al sitio activo de la polimerasa actuando como terminadores de la cadena de RNA naciente. Son efectivos frente a todos los genotipos y ofrecen una elevada barrera genética al desarrollo de resistencias. Destaca sofosbuvir que ha demostrado una extraordinaria eficacia frente a los genotipos 1-6 en combinación con PR e, incluso, en terapias libres de IFN en combinación con daclatasvir o ledipasvir frente a los genotipos 2 y 3 o 1, respectivamente (Lange y col., 2014; Gane y col., 2013). Los **inhibidores de nucleós(t)idos** se unen a uno de los cuatro sitios alostéricos de la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) alterando su conformación y bloqueando su función catalítica. Tienen poca cobertura genotípica y una barrera genética muy pequeña al desarrollo de resistencias. Actualmente, sólo

dasabuvir ha sido aprobado para su uso en clínica, pero en terapia combinada con otros DAAs (Pawlotsky y col., 2015; Lange y col., 2014).

Inhibidores de la proteína NS5A. Se unen al dominio I de la proteína NS5A y bloquean la formación de la red membranosa en la que se encuentran los complejos de replicación funcionales de HCV (Berger y col., 2014), proceso en el que NS5A desempeña un papel esencial (Reiss y col., 2013). Además, inhiben los procesos de ensamblaje y secreción de partículas virales (McGivern y col., 2014). Los inhibidores de primera generación (daclatasvir, ledipasvir y ombitasvir) se encuentran actualmente aprobados para su uso en terapia combinada ya que muestran actividad pangenotípica y tienen una reducida toxicidad aunque presentan una barrera genética pequeña al desarrollo de resistencias. Los de segunda generación (elbasvir) aún están en fase de desarrollo clínico (Pawlotsky y col., 2015; Lange y col., 2014).

Actualmente, se encuentran en fase de estudio nuevos DAAs dirigidos frente a las proteínas NS4B y p7 del virus (Bartenschlager, Lohmann, y Penin 2013).

12.3.- Desarrollo de agentes antivirales que actúan sobre dianas celulares (HTAs)

Dada la enorme constelación de secuencias virales que circulan por el mundo, la ausencia de datos de campo sobre la eficacia de los tratamientos, los precedentes en la aparición de resistencias con virus como el HIV-I y la no despreciable cifra de 3-4

millones de nuevos contagios anuales por HCV por falta de una vacuna profiláctica eficaz, surge la necesidad de desarrollar nuevas estrategias antivirales que exploren alternativas para contener la posible emergencia de variantes resistentes. En este contexto, la identificación de fármacos frente a dianas celulares para su inclusión en terapias combinadas con DAAs cobra especial importancia (Zeisel y col., 2013; Fofana y col., 2014). Al presentar mecanismos de acción complementarios a los DAAs, podrían actuar de manera sinérgica conteniendo la expansión de mutantes resistentes y cubriendo, potencialmente, un mayor número de genotipos. Al contener el uso, por parte del virus, de los recursos celulares a los que van dirigidos, los HTAs podrían contribuir a revertir la patogénesis asociada a la infección por HCV así como a estimular la respuesta inmune innata del hospedador facilitando la eliminación del virus (Lange y col., 2014; Scheel y Rice 2013; Zeisel y col., 2013).

Muchos aspectos del ciclo de vida de HCV dependen de factores celulares que podrían ser empleados como diana de diferentes HTAs. Sin embargo, al estar dirigidos frente a recursos celulares, su empleo se asocia con importantes efectos adversos que han limitado su implementación en monoterapia. Actualmente, los HTAs desarrollados se encuentran en diferentes fases de estudio clínico y pre-clínico (Zeisel y col., 2013).

El fármaco Alisporivir (DEBIO-025), por ejemplo, es un inhibidor de la CypA, una enzima celular que se une a la proteína NS5A del virus e induce cambios en su conformación necesarios para la replicación del RNA (Yang y col., 2008). Alisporivir bloquea la unión CypA-NS5A por lo que su administración se ha visto

que inhibe la infección por HCV tanto *in vitro* como *in vivo*, siendo efectivo frente a todos los genotipos y mostrando una barrera genética muy elevada al desarrollo de resistencias (Zeisel y col., 2013; Bartenschlager, Lohmann, y Penin 2013). Sin embargo, su empleo en terapia combinada con PR llevó a la aparición de algunos casos de pancreatitis, dejando en espera su uso en clínica (Scheel y Rice 2013).

El compuesto Miravirsén (SPC3649) está dirigido frente al miRNA-122 (Lanford y col., 2010; Janssen y col., 2013), un microRNA específico de tejido hepático que se une a dos sitios altamente conservados del extremo 5'-UTR del genoma de HCV (Jopling y col., 2005). Dicha unión parece estimular su traducción y replicación protegiéndolo, además, del reconocimiento mediado por receptores de la respuesta innata como RIG-I (Gen I inducible por ácido retinoico) y de su degradación por la 5'-3' exoribonucleasa 1 (XRN1) (Bartenschlager, Lohmann, y Penin 2013; Scheel y Rice 2013). Estudios clínicos en fase II con Miravirsén muestran una actividad antiviral significativa y una gran barrera genética al desarrollo de resistencias (Lange y col., 2014; Zeisel y col., 2013). Sin embargo, se ha visto que la supresión de miRNA-122 en ratones es altamente oncogénica además de provocar la aparición de esteatohepatitis, fibrosis y carcinoma hepático (Hsu y col., 2012; Tsai y col., 2012). Esta propiedad del miRNA-122 como supresor de tumores y su papel en la homeostasis lipídica hepática limitan el empleo terapéutico de antagonistas del miRNA-122 (Bartenschlager, Lohmann, y Penin 2013; Scheel y Rice 2013).

A pesar de las limitaciones que ofrece el uso de los HTAs actualmente disponibles y aún siendo necesaria una investigación más

profunda en términos de tolerabilidad y eficacia, los avances logrados en los últimos años con el desarrollo de DAAs y HTAs y su empleo en terapias combinadas ofrecen un futuro prometedor. Potencialmente, el uso combinado de DAAs y HTAs permitirá curar a la mayoría de pacientes infectados con HCV empleando una terapia oral y libre de IFN, con un reducido número de efectos secundarios adversos asociados y una limitada incompatibilidad entre fármacos. Sin embargo, el elevado coste de este tipo de terapias limita su implementación, especialmente, en países con pocos recursos económicos, por lo que éste ha de ser otro de los aspectos importantes a abordar en el desarrollo de futuras estrategias antivirales (Lange y col., 2014; Pawlotsky y col., 2015; Scheel y Rice 2013; Bartenschlager, Lohmann, y Penin 2013).

13.- Biología molecular del virus de la hepatitis C

El virus de la hepatitis C, miembro representativo del género *Hepacivirus* y perteneciente a la familia *Flaviviridae* (Moradpour, Penin, y Rice 2007), infecta principalmente hepatocitos aunque también se ha descrito la infección de otros tipos celulares como los linfocitos B y T, las células dendríticas y los monocitos (Kondo y Shimosegawa 2013).

Se trata de un virus pequeño, con envuelta y genoma de RNA monocatenario y polaridad positiva de aproximadamente 9600 nucleótidos. Dicho genoma está compuesto por un único marco abierto de lectura (ORF) que se encuentra flanqueado, en sus extremos 5' y 3', por dos secuencias no traducidas (UTR)

(Moradpour, Penin, y Rice 2007). La región 5'-UTR se encuentra altamente conservada entre aislados diferentes; contiene un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES), esencial para el proceso de traducción (Otto y Puglisi 2004), así como cuatro dominios estructurales (I a IV), dos de los cuales (I y II) son necesarios para la unión del miRNA-122; dicha unión potencia tanto la traducción como la replicación del RNA viral (Jopling y col., 2005; Jopling 2008) (Figura 11A). La región 3'-UTR también está implicada en la replicación del RNA viral tanto *in vivo* como *in vitro* (Friebe y Bartenschlager 2002; Yi y Lemon 2003; Yanagi y col., 1999; Kolykhalov y col., 2000) (Figura 11A). El genoma viral codifica una poliproteína de unos 3011 aminoácidos que es procesada, co- y post-traduccionalmente, por proteasas celulares y virales para dar lugar a tres proteínas estructurales (core, E1 y E2) y siete proteínas no estructurales (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B) (Moradpour, Penin, y Rice 2007) (Figura 11A).

13.1.- Estructura y función de las proteínas de HCV

La proteína **Core** es el componente estructural de la nucleocápsida viral. Presenta un dominio de unión a RNA y su asociación a la membrana del retículo endoplásmico (RE) (Figura 11B) le implica en los procesos de replicación y morfogénesis del virión (Hope y McLauchlan 2000; Boulant y col., 2006). Juega un papel importante en la patogénesis asociada a la infección crónica por HCV ya que su asociación a gotas lipídicas (LDs) y su interacción con diferentes proteínas celulares (ver sección 14) induce cambios en el metabolismo lipídico de la célula que

contribuyen al desarrollo de esteatosis hepática (Syed, Amako, y Siddiqui 2010; Negro y Sanyal 2009; Negro 2006).

Las glicoproteínas de la envuelta, **E1** y **E2**, forman un complejo no covalente (heterodímero E1-E2) que constituye el componente mayoritario de la envuelta del

virus (Dubuisson, Penin, y Moradpour 2002). Participan en la unión a receptores celulares y en la fusión a la célula hospedadora (Goffard y col., 2005; Moradpour, Penin, y Rice 2007) por lo que E1 y E2 se consideran proteínas clave en la entrada viral (Bartosch y Cosset 2006) y en el ensamblaje de partículas infecciosas

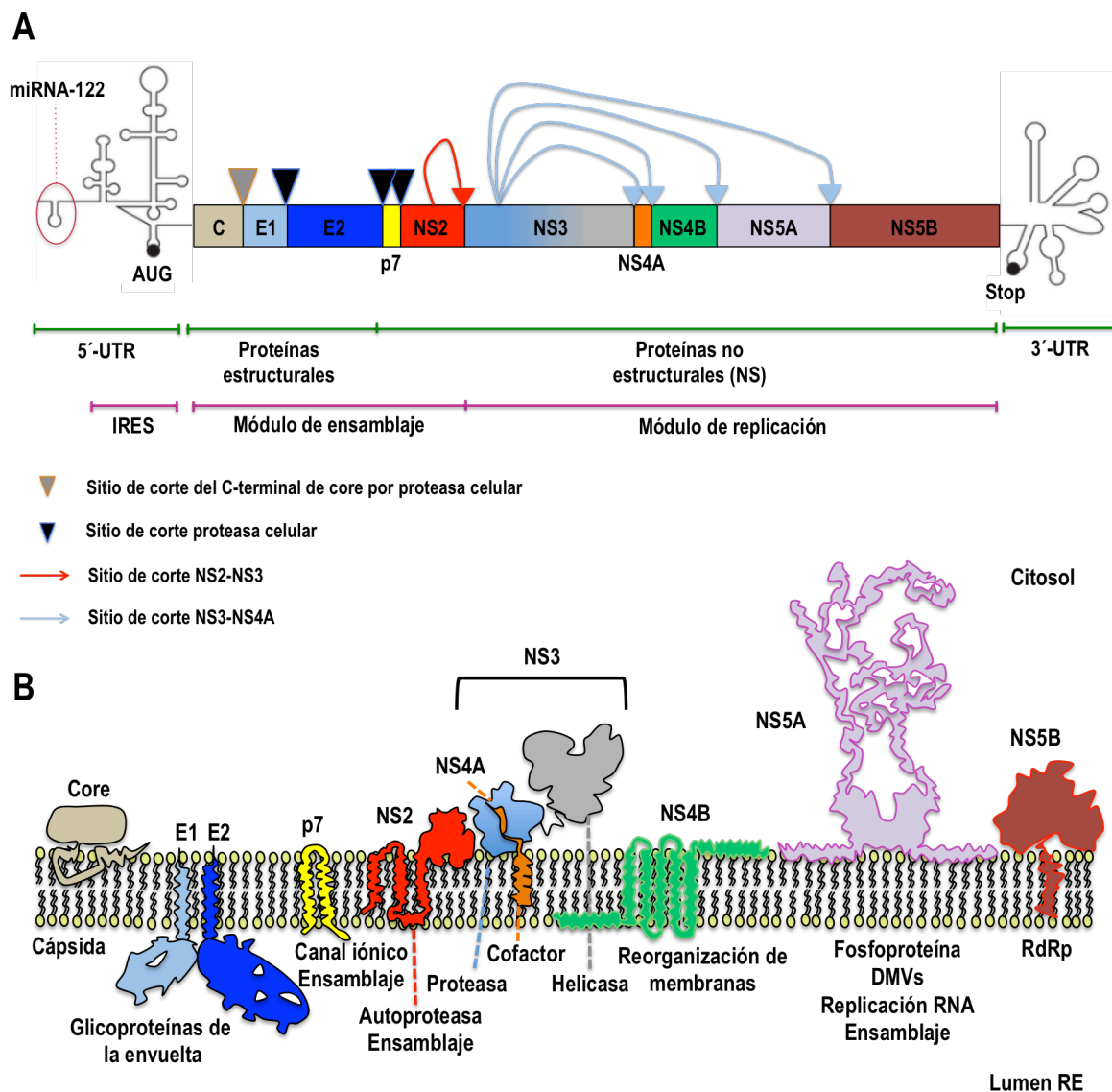


Figura I1. Estructura del genoma de HCV, procesamiento de la poliproteína y topología de las proteínas virales. (A) Esquema del genoma de HCV en el que se representan sus distintas regiones (en línea verde, anotación estructural; en línea violeta, anotación funcional) así como el procesamiento de la poliproteína a través de proteasas celulares y virales. Se indica además la localización de los codones de iniciación y terminación de la traducción en los extremos 5' y 3' del genoma de HCV, respectivamente, así como el sitio de unión del miRNA-122 a la región 5'-UTR de dicho genoma. (B) Localización en la membrana del retículo endoplásmico (RE) y funciones principales de las distintas proteínas de HCV.

(Wakita y col., 2005) (Figura I1B). La proteína E2, en su región N-terminal, presenta dos secuencias altamente heterogéneas denominadas región hipervariable I y II (HVR-I y HVR-II), respectivamente, que han sido empleadas para estudios de diversidad genética de HCV. Se cree que estas regiones se originan en respuesta a presiones selectivas ejercidas por anticuerpos neutralizantes frente al virus y que, dada su elevada heterogeneidad genética, podrían ser empleadas por HCV para evadir la respuesta del sistema inmunitario y facilitar el establecimiento de una infección crónica (Boulestin y col., 2002; Polyak y col., 1998).

La proteína **p7** es una viroporina con función de canal iónico que está implicada en morfogénesis y secreción del virión infeccioso (Dubuisson 2007; Penin y col., 2004; Griffin y col., 2003) (Figura I1B). Aunque no parece necesaria para la replicación del RNA viral resulta esencial para la infección *in vivo* (Sakai y col., 2003).

La proteína **NS2**, junto con parte de la proteína NS3, forma la proteasa NS2-3 o autoproteasa del virus encargada de catalizar la proteólisis del sitio de unión existente entre NS2 y NS3 (Grakoui y col., 1993; Hijikata, Mizushima, y col., 1993). Participa en los procesos de ensamblaje y secreción de la partícula viral (Pietschmann y col., 2006) (Figura I1A-B).

La proteína **NS3** es una proteína multifuncional con actividad serín-proteasa (en su región N-terminal) y RNA helicasa/NTPasa (en su extremo C-terminal) (Figura I1B). A través de su interacción con el cofactor NS4A forma el complejo NS3-4A cuya actividad serín-proteasa permite el procesamiento de la poliproteína del virus al catalizar la proteólisis de las uniones NS3-4A,

NS4A-4B, NS4B-5A y NS5A-5B (Penin y col., 2004; Moradpour y Penin 2013) (Figura I1A). Además, este complejo procesa e inactiva las proteínas MAVS (adaptador mitocondrial de señalización antiviral) y TRIF (activador de interferón asociado al receptor Toll), bloqueando la respuesta inmune innata del hospedador y favoreciendo la persistencia del virus (Horner y Gale 2013). La proteína celular GPx8 (glutación peroxidasa 8), cuya actividad catalítica se ha visto que facilita la producción de partículas de HCV, también es procesada por el complejo NS3-4A (Morikawa y col., 2014). La actividad helicasa de la proteína NS3 es esencial para el proceso de replicación, probablemente, favoreciendo la procesividad de la polimerasa en regiones de RNA altamente estructurado (Wolk y col., 2000; Paul, Madan, y Bartenschlager 2014).

La proteína **NS4B** induce la formación de unas redes membranosas que sirven como soporte para el ensamblaje de los complejos de replicación de HCV en un proceso concertado con otras proteínas no estructurales del virus como NS5A (Romero-Brey y col., 2012; Lohmann 2013; Egger y col., 2002) (Figura I1B). Juega, por tanto, un papel crítico en la replicación del RNA viral y en la formación de viriones infecciosos (Jones y col., 2009; Paul y col., 2011).

NS5A es una fosfoproteína con capacidad de unión a RNA que puede presentarse en un estado de fosforilación basal (56 kDa) o en estado hiperfosforilado (58 kDa) y modular así la eficiencia del proceso de replicación (Evans, Rice, y Goff 2004; Neddermann y col., 2004; Appel, Pietschmann, y Bartenschlager 2005). Es un componente esencial de la replicasa del virus ya que sirve como plataforma para el reclutamiento de diferentes factores celulares

(PI4K-III α , PI4P, Anexina AII, OSBP,...) necesarios en su ensamblaje y funcionamiento (Penin y col., 2004; Alvisi, Madan, y Bartenschlager 2011; Reiss y col., 2013). Además, interacciona con el RNA del virus dirigiéndolo hacia diferentes procesos (traducción, replicación o ensamblaje de la partícula viral) y protegiéndolo frente a la acción de RNAsas y diversos mecanismos de defensa antiviral (Moradpour, Penin, y Rice 2007). Su interacción con diferentes proteínas celulares le confiere un papel modulador en varias cascadas de señalización (Macdonald y Harris 2004). Co-localiza con la proteína core en la superficie de LDs sugiriendo una posible participación de NS5A en la morfogénesis del virión (Gawlik y col., 2014; Herker y Ott 2011; Miyanari y col., 2007). Se cree que NS5A estimula la actividad de NS5B (Lohmann 2013). En NS5A se localizan dos regiones importantes que afectan a la respuesta al tratamiento con PEG-IFN- α y ribavirina, denominadas IRRDR (región determinante de la resistencia a interferón y ribavirina) e ISDR (región determinante de la sensibilidad a interferón) (El-Shamy y col., 2007; Enomoto y col., 1996) (Figura I1B).

La proteína **NS5B** es una RNA polimerasa dependiente de RNA que constituye el componente catalítico del complejo de replicación de HCV (Figura I1B). La actividad RdRp parece estar modulada por la interacción de NS5B con otras proteínas virales (NS3 y NS5A, principalmente) (Bartenschlager, Frese, y Pietschmann 2004). NS5B interacciona con diferentes proteínas celulares, entre ellas, la ciclofilina B que, al potenciar su actividad de unión a RNA, incrementa la replicación del virus (Watashi y col., 2005). Esta polimerasa carece de actividad Exo 3'-5' (exonucleasa 3'-5') lo que

explica la elevada tasa de mutación y la enorme diversidad genética que exhiben los virus de la hepatitis C (Steinhauer, Domingo, y Holland 1992).

Se han identificado marcos abiertos de lectura alternativos en la región codificante de la proteína Core del genotipo 1a que dan lugar a las proteínas **ARFP** y **F** cuyas funciones en el ciclo replicativo del virus o en la patogénesis asociada a su infección no están claras (Branch y col., 2005).

Todas las proteínas de HCV están asociadas a membranas intracelulares ya sea directa o indirectamente, como en el caso de NS3, que necesita de NS4A para anclarse a la membrana del RE (Paul, Madan, y Bartenschlager 2014; Moradpour, Penin, y Rice 2007) (Figura I1B).

I3.2.- Estructura del virión de HCV

Los viriones de HCV presentan un diámetro aproximado de 40-80 nm y muestran una apariencia pleomórfica (Gastaminza y col., 2010; Merz y col., 2011; Catanese y col., 2013). Su nucleocápsida, compuesta por la proteína core, alberga el genoma de HCV y ésta rodeada por una bicapa lipídica que deriva del RE y en la que se encuentran embebidas, formando heterodímeros, las glicoproteínas E1 y E2 (Catanese y col., 2013). No existen evidencias bioquímicas acerca de la presencia inequívoca de otras proteínas virales en el virión, pero sí de proteínas celulares como las apolipoproteínas apoE, apoCIII, apoAI y apoB que podrían facilitar tanto su ensamblaje como su entrada en la célula (Popescu y col., 2014; Catanese y col., 2013).

En el suero de pacientes, HCV se encuentra como una población heterogénea de partículas virales con densidades comprendidas entre 1.03 y 1.25 g/ml (Andre y col., 2002; Hijikata, Shimizu, y col., 1993; Kanto y col., 1995; Lindenbach y col., 2005; Miyamoto y col., 1992; Nielsen y col., 2006; Pumeechockchai y col., 2002; Thomssen, Bonk, y Thiele 1993; Trestard y col., 1998; Watson y col., 1996; Thomssen y col., 1992; Zhong y col., 2005). En este rango, se ha detectado RNA viral asociado a diferentes tipos de partículas que incluyen nucleocápsidas sin envuelta, estructuras similares a exosomas (vesículas que contienen RNA viral, proteínas de la envuelta y CD81) y lipovirionpartículas (LVP), siendo esta última fracción la más representada (Catanese y col., 2013; Gastaminza y col., 2010; Merz y col., 2011; Masciopinto y col., 2004). La asociación de HCV con lipoproteínas de baja (LDL) y muy baja densidad (VLDL) explica la existencia de LVP (Bartenschlager y col., 2011) así como la baja densidad de flotación (<1.10 g/ml) que exhibe la fracción de viriones con mayor infectividad, tanto en chimpancé como en cultivo celular (Lindenbach 2013). Las fracciones con mayor densidad, por el contrario, son las menos infecciosas y parecen estar formando inmunocomplejos (Catanese y col., 2013; Gastaminza y col., 2010).

I3.3.- Ciclo de vida del virus de la hepatitis C y herramientas empleadas en su estudio

El ciclo vital de HCV es citoplasmático y depende tanto de diversas membranas celulares como de las principales vías de síntesis de lípidos. Prácticamente cualquier aspecto del ciclo de vida de HCV está asociado

al metabolismo lipídico de la célula (Popescu y col., 2014; Paul, Madan, y Bartenschlager 2014).

I3.3.1.- La entrada de HCV depende del reconocimiento de proteínas virales y las apolipoproteínas celulares y colesterol asociados al virión

La entrada de HCV en el hepatocito es un proceso complejo que requiere de la interacción coordinada, tanto espacial como temporalmente, con diferentes receptores de la superficie celular que median en el reconocimiento de las proteínas virales (E1E2) y las apolipoproteínas (apoE y apoB, mayoritariamente) y ésteres de colesterol asociados al virión (Ploss y Evans 2012; Lindenbach y Rice 2013; Popescu y col., 2014). El reconocimiento de estos factores, tanto celulares como virales, determina en parte el tropismo hepatocelular de HCV (Lindenbach y Rice 2013; Ding, von Schaewen, y Ploss 2014). La unión inicial de HCV a la célula hospedadora tiene lugar mediante interacciones de baja afinidad con glicosaminoglicanos (GAGs) y el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR) (Lindenbach y Rice 2013) (Figura I2A-1). Además, el virion se une, al menos, a otros cinco receptores esenciales para su entrada: la tetraspanina CD81, el receptor scavenger clase B tipo I (SR-BI), las uniones estrechas Claudina 1 (CLDN1) y Ocludina (OCLN) y el receptor de colesterol NPC1L1 (Lindenbach y Rice 2013) (Figura I2A-2). Las lipoproteínas asociadas al virión se unen a la superficie del hepatocito a través de su interacción con GAGs y los receptores LDLR y SR-BI (Agnello y col., 1999; Germi y col., 2002; Monazahian y

col., 1999; Albecka y col., 2012; Dao Thi y col., 2012) (Figura I2A-1). La contribución de SR-BI a la entrada viral es múltiple ya que además de su unión a las lipoproteínas del virión, interacciona con la región HVR-I de E2 permitiendo su reconocimiento por CD81 y, a través de su actividad para la transferencia de lípidos, se cree que media en un evento necesario para la entrada productiva del virus (Dao Thi y col., 2012; Zahid y col., 2013) (Figura I2A-1 y 2). A continuación, CD81 se une directamente a la glicoproteína E2 (Bankwitz y col., 2010) permitiendo el desplazamiento de la partícula viral hacia la cara basolateral del hepatocito y facilitando su interacción con CLDN1 (Lindenbach y Rice 2013) (Figura I2A-2). La interacción HCV-CD81 con CLDN1 induce la endocitosis mediada por clatrina para la internalización del virión (Farquhar y col., 2012; Harris y col., 2010; Evans y col., 2007) (Figura I2A-3). No está claro que OCLN interaccione directamente con la partícula viral, pero se cree que participaría en un evento posterior a la unión inicial del virión (Ploss y col., 2009; Sourisseau y col., 2013). El receptor NPC1L1 que aparece en la superficie apical y canalicular de los hepatocitos donde participa en la absorción de colesterol puede ser, además, fácilmente internalizado en el compartimento endosomal. Aunque no se conoce su mecanismo exacto, se cree que la entrada de HCV a través de este receptor estaría acoplada a la absorción de colesterol (Jia, Betters, y Yu 2011; Sainz y col., 2012)(Figura I2A-2).

Se ha visto que la transmisión directa célula a célula a través de uniones estrechas sin liberación de partículas al medio extracelular es importante en el ciclo infeccioso de HCV pudiendo ser ésta una estrategia del virus para evitar su neutralización por

anticuerpos circulantes (Timpe y col., 2008). Tras la endocitosis mediada por clatrina (Figura I2A-3), los complejos formados por los distintos receptores que median en la entrada de HCV son transportados hacia compartimentos endosomales (Farquhar y col., 2012; Coller y col., 2009), desde donde pueden ser reciclados o transportados a lisosomas para su completa degradación (Hsu, Bai, y Li 2012). La interacción de E2 con CD81 podría preparar a las glicoproteínas para responder al bajo pH que hay en los compartimentos endosomales y mediar así en la fusión de las membranas plasmática y endosomal (Sharma y col., 2011) (Figura I2A-4). Como resultado del proceso de fusión, el genoma viral queda libre en el citosol desde donde puede ser directamente traducido para generar las proteínas virales o reclutado a los complejos de replicación (Niepmann 2013) (Figura I2A-4).

La identificación y caracterización de estos receptores, el análisis de la funcionalidad de las secuencias de E1 y E2 que median en su reconocimiento, el estudio de la neutralización de HCV por anticuerpos circulantes o el diseño de algunos fármacos (HTAs) que se estudian en clínica para terapia antiviral no fue posible hasta el desarrollo del sistema de infección basado en partículas retrovirales pseudotipadas de HCV (HCV_{pp}) (sección M5.1) en 2003 (Bartosch y Dubuisson 2010).

I3.3.2.- La traducción del genoma viral depende de la autofagia y del miRNA-122

El RNA viral liberado en el citosol es traducido en la membrana del RE en un proceso que depende del elemento IRES,

presente en el extremo 5'-UTR del genoma, y que da lugar a la poliproteína viral (Moradpour, Penin, y Rice 2007; Lohmann 2013). La unión del miRNA-122 a dos sitios diana en la región 5'-UTR del genoma de HCV estimula su asociación a la subunidad pequeña del ribosoma y promueve su traducción (Henke y col., 2008; Jopling 2008). Asimismo, la maquinaria implicada en el proceso de autofagia parece necesaria para el transporte del RNA viral entrante hacia el complejo de traducción y/o para su eficiente traducción (Dreux y col., 2009). Además, se cree que membranas derivadas de autofagosomas podrían servir como plataforma para el ensamblaje del complejo de traducción (Dreux y col., 2009).

La poliproteína resultante es procesada co y post-traduccionalmente para dar lugar a las proteínas estructurales y no estructurales del virus. La región N-terminal de la poliproteína es procesada por proteasas celulares para liberar las proteínas estructurales (core, E1 y E2) y la proteína p7. El resto de la poliproteína es procesado por proteasas virales: la autoproteasa NS2-NS3, que rompe la unión NS2-NS3, y la serín-proteasa NS3-4A que libera las proteínas del complejo de replicación del virus (NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B) (Moradpour, Penin, y Rice 2007; Lohmann 2013).

I3.3.3.- La replicación del RNA viral tiene lugar en compartimentos membranosos y depende de las principales rutas de biosíntesis de lípidos

La replicación del RNA viral es un proceso complejo que requiere de la acción coordinada entre proteínas virales y celulares

(Lohmann 2013). Ésta consiste en la síntesis de una población abundante de moléculas RNA de polaridad positiva a partir de un intermediario RNA de polaridad negativa. Las moléculas de RNA recién sintetizadas quedan en el citoplasma de la célula a disposición del proceso de traducción o para su posterior incorporación en nuevas partículas virales (Lohmann 2013). La síntesis de RNA depende de la actividad RdRp de la proteína NS5B pero se trata de un proceso concertado con el resto de proteínas no estructurales del virus, desde NS3 a NS5B, que conforman la replicasa viral y con múltiples factores celulares, como la ciclofilina A o el miRNA-122 (Lohmann 2013; Scheel y Rice 2013; Jopling 2008).

De manera análoga a otros virus RNA de polaridad positiva, el virus de la hepatitis C remodela el sistema de membranas intracelular para formar también llamadas factorías virales de replicación (FVR), que permiten incrementar la concentración local de los factores virales y celulares requeridos para la replicación eficiente del RNA, coordinar espacialmente diferentes pasos del ciclo replicativo del virus (traducción, replicación y ensamblaje del virión) y proteger las proteínas virales y el RNA de HCV de la acción de diferentes proteasas celulares y mecanismos de defensa antiviral (Moradpour, Penin, y Rice 2007; Paul, Madan, y Bartenschlager 2014) (Figura I2B). Estudios de microscopía electrónica revelan que estas FVR son, estructuralmente, vesículas de doble membrana (DMVs) que derivan mayoritariamente del RE aunque también están asociadas a LDs (Romero-Brey y col., 2012) y que se encuentran embebidas en una matriz membranosa (membranous web) con características de lipid rafts por su alto contenido en esfingomielina y colesterol

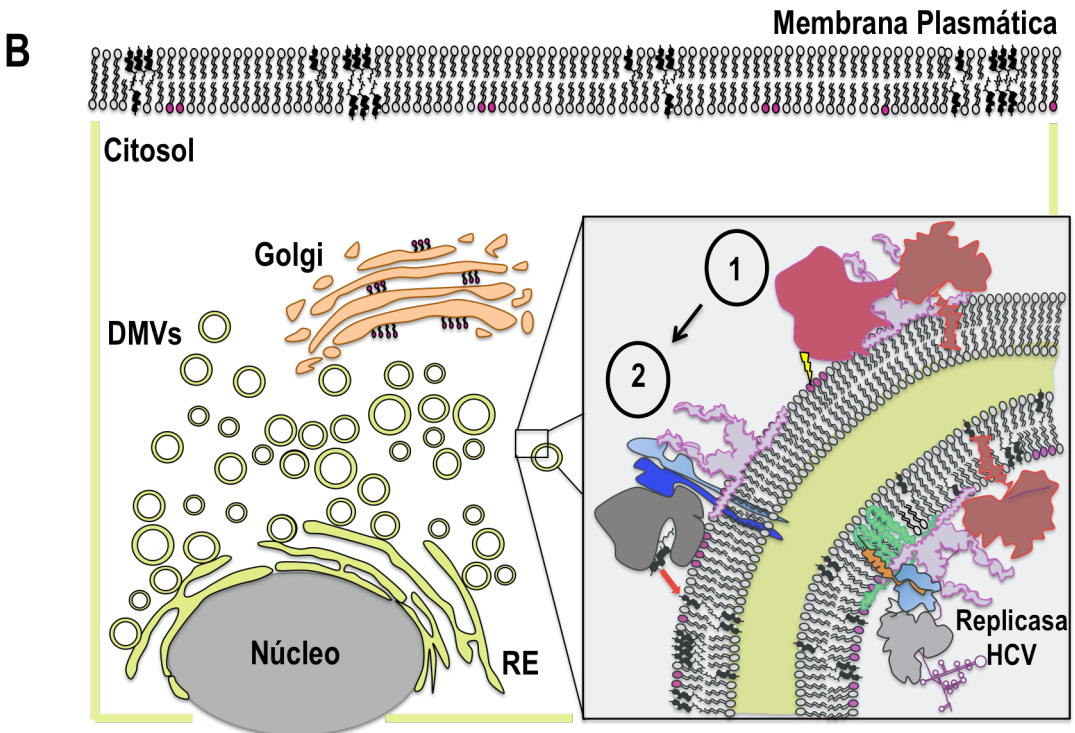
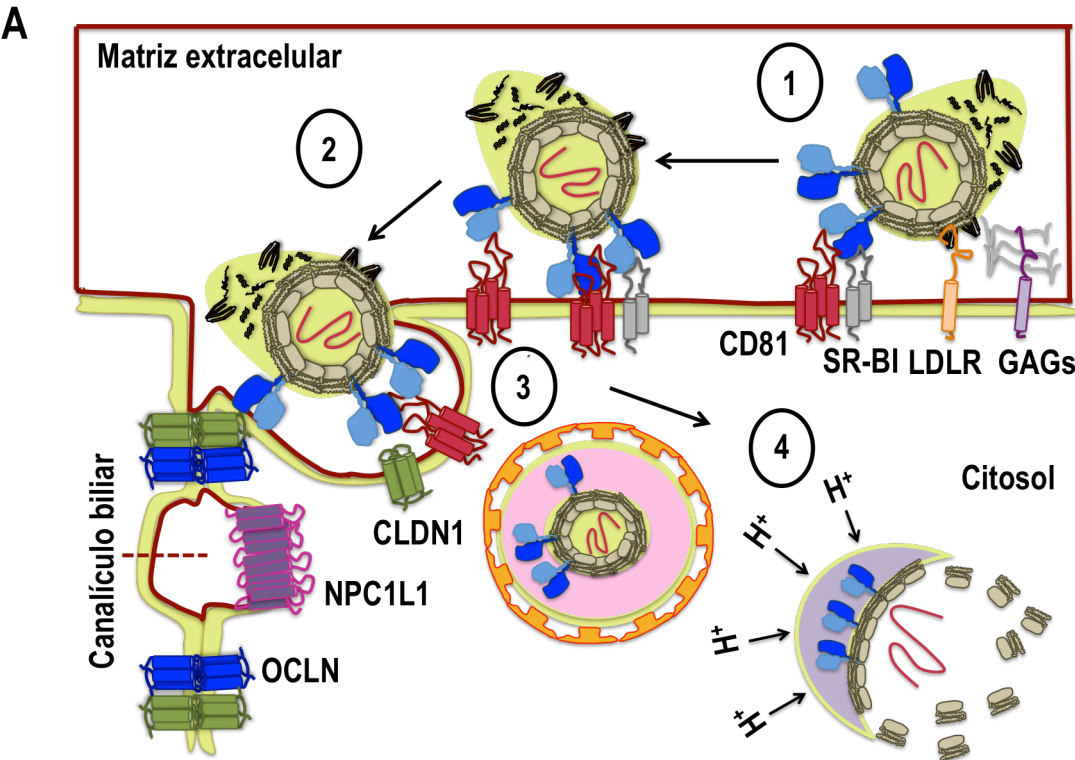
(Romero-Brey y col., 2012; Herker y Ott 2011; Aizaki y col., 2004).

Todas las proteínas de la replicasa viral (desde NS3 a NS5B) son necesarias para la formación de las DMVs, siendo NS4B y NS5A los actores principales (Paul, Madan, y Bartenschlager 2014; Romero-Brey y col., 2012). No obstante, se requiere de la acción concertada con algunas proteínas celulares como la CypA que interacciona directamente con NS5A (Madan y col., 2014) o la proteína 2 de interacción con prolina-serina-treonina fosfatasas (PSTPIP2) que, a través de su interacción con NS4B y NS5A, es reclutada en las DMVs para modular la curvatura de sus membranas (Chao y col., 2012).

Además de remodelar las membranas intracelulares existentes, HCV induce la lipogénesis *de novo* y la biogénesis de nuevas membranas a través de la activación transcripcional de las proteínas de unión al elemento de respuesta a esteroides (SREBPs) (Waris y col., 2007), siendo éste un proceso mediado, principalmente, por las proteínas NS4B y core (Park y col., 2009; Waris y col., 2007). Ello provoca importantes cambios en el perfil lipídico de las células infectadas por HCV (Diamond y col., 2010) ya que conduce a aumento en la expresión de genes implicados en la biosíntesis de colesterol y ácidos grasos; tal es el caso del gen que codifica la enzima sintasa de ácidos grasos (*FASN*) que interacciona con NS5B estimulando su actividad RdRp y favoreciendo así la replicación viral (Huang y col., 2013). La represión del factor de transcripción PPAR α (receptor alfa activado por proliferadores de peroxisomas), mediada por la proteína core, disminuye la expresión de genes implicados en la degradación y oxidación de ácidos grasos contribuyendo a un aumento en su

disponibilidad por la célula para la síntesis defosfolípidos y triglicéridos (TAG) (Alvisi, Madan, y Bartenschlager 2011; Blackham y col., 2010; Woodhouse y col., 2010; de Gottardi y col., 2006).

Otro aspecto determinante en la formación y dinámica de las DMVs tiene que ver con la composición de lípidos local. Existe una enorme interdependencia entre la replicación de HCV y la actividad de la fosfatidilinositol-4-quinasa III α (PI4K-III α) y su sustrato, el fosfatidil inositol-4-fosfato (PI4P). La PI4K-III α a través de su interacción, presumiblemente, con las proteínas NS5A y NS5B es reclutada en las DMVs para aumentar los niveles intracelulares de PI4P lo que provoca cambios en el contenido lipídico de las membranas de las DMVs y modula su funcionalidad (Alvisi, Madan, y Bartenschlager 2011; Berger y col., 2011; Reiss y col., 2011; Bianco y col., 2012) (Figura I2B-1). Además, la presencia de PI4P en estas DMVs permite el reclutamiento de proteínas celulares necesarias en el ensamblaje de las FVRs y en la replicación del RNA viral. Una de estas proteínas es la Anexina AII, también implicada en el ensamblaje del virión (Backes y col., 2010), o la proteína de unión a oxisterol (OSBP) que permite el transporte de colesterol hacia las membranas de las DMVs para participar en su biogénesis, aunque también está implicada en la síntesis de esfingomielina, autofagia y en la biogénesis de LDs (Alvisi, Madan, y Bartenschlager 2011; Wang y col., 2014). El transporte de colesterol, mediado por OSBP, es estimulado por las proteínas VAPA y VAPB (proteínas asociadas a VAMP), necesarias para la replicación del RNA viral y reclutadas al complejo de la replicasa viral a través de su interacción con NS5A



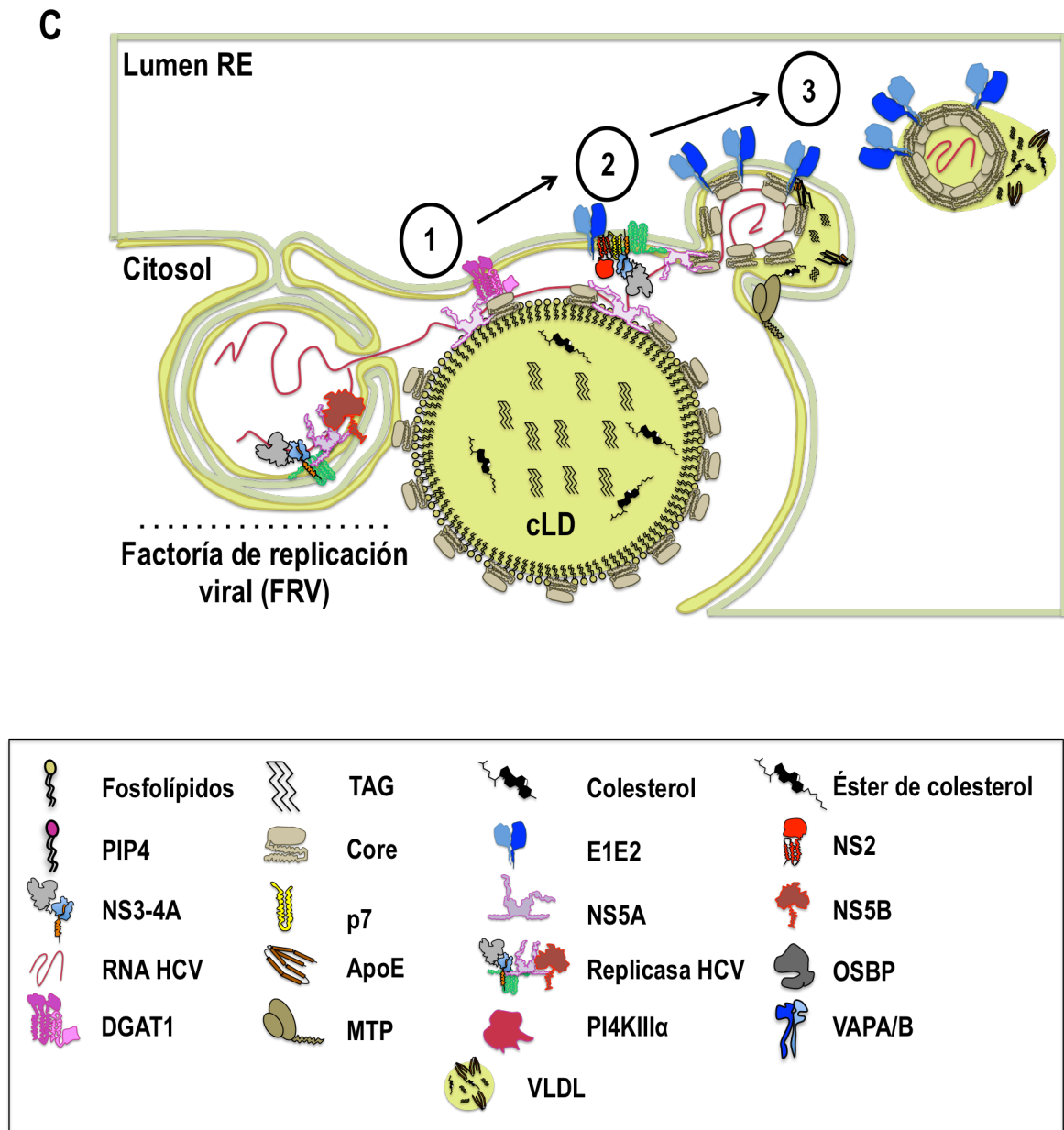


Figura I2. Ilustración de los principales aspectos del ciclo replicativo de HCV asociados al metabolismo de lípidos celular. (A) Entrada del virus a la célula hospedadora. (B) Estructura y biogénesis de los complejos de replicación virales. (C) Ensamblaje de viriones. *Ver detalles en el texto.*

(Evans, Rice, y Goff 2004; Gao y col., 2004; Wang y col., 2014) (Figura I2B-2).

Como vemos, la replicación de HCV depende del metabolismo de colesterol y ácidos grasos de la célula. Pero además se cree que HCV podría explotar el mecanismo de autofagia de la célula para la formación de

sus FRVs. La infección por HCV induce la lipidación del factor LC3 (cadena ligera 3 de la proteína 1 asociada a microtúbulos) implicado en la formación de autofagosomas (Dreux y col., 2009) y se ha visto que la forma LC3 lipidada se asocia a membranas en las que también están presentes proteínas del virus

(Ferraris, Blanchard, y Roingeard 2010). No obstante, existe controversia acerca de su implicación en el proceso de replicación. Hay autores que sugieren que los autofagosomas podrían servir como plataforma para la síntesis de RNA (Sir y col., 2012) mientras que Romero-Brey y colaboradores no observan marcadores de estas estructuras en las DMVs (Romero-Brey y col., 2012); otros, sin embargo, proponen que la autofagia estimularía la replicación viral al suprimir la respuesta inmune innata del hospedador (Ke y Chen 2011).

El estudio de los mecanismos moleculares que subyacen a los procesos de traducción y replicación del genoma viral no fue posible hasta el desarrollo, en 1999, del sistema del replicón basado en el empleo de mini-genomas con capacidad para replicar de manera autónoma por contener los elementos necesarios para ello (sección M3). Su empleo ha permitido la identificación y caracterización de los inhibidores (DAAs) que se emplean actualmente en la terapia anti-HCV (Bartenschlager, Lohmann, y Penin 2013).

13.3.4.- Los viriones infecciosos se ensamblan en la interfaz del RE en un proceso que depende de gotas lipídicas (LDs) y elementos de la biosíntesis de lipoproteínas hepáticas

Las partículas de HCV nacientes se forman mediante un proceso de gemación que tiene lugar en la interfaz del RE y que implica la acción coordinada, tanto espacial como temporalmente de, virtualmente, todas las proteínas del virus (Lindenbach y Rice 2013; Paul, Madan, y Bartenschlager 2014) (Figura I2C). Inmediatamente después de su traducción, la proteína core se acumula en la

superficie de gotas lipídicas presentes en el citosol (cLDs) (Miyanari y col., 2007; Barba y col., 1997; Boulant y col., 2005; Moradpour y col., 1996), en un proceso que depende de enzimas celulares implicadas en la homeostasis de LDs, principales reservorios de lípidos neutros de la célula (Miyanari y col., 2007), como son la fosfolipasa A2 (PLA2) (Menzel y col., 2012) y la diacilglicerol aciltransferasa 1 (DGAT1) (Herker y col., 2010) (Figura I2C-1). Tras la replicación del RNA, la proteína NS5A es hiperfosforilada por la caseína-quinasa II alfa (CKIIα) (Tellinghuisen, Foss, y Treadaway 2008) para su reclutamiento hacia los cLDs (Masaki y col., 2014). DGAT1 también participa en dicho reclutamiento permitiendo, así, la interacción core-NS5A (Camus y col., 2013). Se cree que la translocación de NS5A junto con el resto de componentes de la replicasa viral a los cLDs representa la transición entre el proceso de replicación *per se* y el ensamblaje de la partícula viral (Lindenbach y Rice 2013). Así, la interacción core-NS5A permitiría la transferencia del RNA recién sintetizado desde la replicasa viral a las proximidades de core (Miyanari y col., 2007; Appel y col., 2008; Masaki y col., 2008) para el ensamblaje de la nucleocápsida del virus (Lohmann 2013) (Figura I2C-1).

Se asume que la formación de la nucleocápsida y el proceso de gemación de la partícula viral están, temporal y espacialmente, acoplados (Lindenbach y Rice 2013). En este sentido, las proteínas p7 y NS2 presentan un papel esencial (Jirasko y col., 2010; Popescu y col., 2011) ya que, por un lado, interaccionan con las glicoproteínas E1E2 para su translocación a la región del RE en que tendrá lugar el ensamblaje del virión (Phan y col., 2009; Lindenbach 2013) y, por

otro, con NS3-4A. A través del complejo NS3-4A, la proteína core que está formando la nucleocápsida se transloca a la región del RE en que se encuentran embebidas las glicoproteínas E1E2 (Boson y col., 2011; Counihan, Rawlinson, y Lindenbach 2011) para, mediante gemación a través de la membrana del RE, formar la envuelta del virus (Popescu y col., 2014; Lindenbach 2013). Aunque no se conoce el mecanismo exacto, se ha visto que NS4B y NS5B también participan en el ensamblaje del virión (Jones y col., 2009; Gouklani y col., 2012; Paul y col., 2011) (Figura I2C-2).

La producción de partículas de HCV se encuentra íntimamente asociada al metabolismo de lipoproteínas celular y depende de la actividad de enzimas como la proteína transportadora de triglicéridos microsomales (MTP) (Figura I2C-3). Esta proteína participa en la formación de VLDL a través de la incorporación de TAG hacia los LDs presentes en el lumen del RE y la lipidación de la apolipoproteína apoB. Aunque existe controversia acerca del grado de incorporación de apoB al virión (Bartenschlager y col., 2011) y de su contribución a la infectividad del mismo (Gastaminza y col., 2008; Jiang y Luo 2009), numerosas evidencias apuntan hacia un papel crucial para apoC1 y, especialmente, apoE en el ensamblaje de HCV (Paul, Madan, y Bartenschlager 2014). De hecho, se ha visto que apoE interacciona directamente con NS5A y las glicoproteínas de la envuelta (Jiang y Luo 2009; Boyer y col., 2014; Lee y col., 2014) y datos funcionales sugieren un posible papel de apoE en un evento posterior a la adquisición de la envuelta viral durante el ensamblaje del virión (Hueging y col., 2014; Lee y col., 2014) (Figura I2C-3). Los viriones de

HCV maduran a través de la ruta secretora en asociación con apoE pero no con apoB (Coller y col., 2012) sugiriendo que, muy posiblemente, el ensamblaje de HCV depende de LDs asociados a la fracción microsomal que contienen apoE más que de la producción de partículas de VLDL, como tal (Paul, Madan, y Bartenschlager 2014). Recientemente se ha demostrado que, tras el ensamblaje de la partícula viral, las vías de secreción de apolipoproteínas y viriones divergen en algún punto de la ruta exocítica (Benedicto y col., 2015).

Se cree que los viriones de HCV son transportados por la vía secretora convencional hacia el aparato de Golgi, donde las glicoproteínas E1E2 sufren una serie de modificaciones que contribuyen a la maduración de la partícula viral y la hacen resistente al pH bajo que media en los procesos de fusión durante su entrada en la célula hospedadora (Vieyres, Dubuisson, y Pietschmann 2014; Tscherne y col., 2006). Además de su participación en el ensamblaje del virión, la proteína p7 contribuye a equilibrar el gradiente de pH a lo largo de la vía secretora estabilizando la partícula viral durante su maduración y salida (Clarke y col., 2006; Griffin y col., 2003; Luik y col., 2009; Wozniak y col., 2010; OuYang y col., 2013); se cree que, a través de su interacción con p7, NS2 también participaría en la salida del virión (de la Fuente, Goodman, y Rice 2013). Asimismo, la maquinaria de transporte microtubular y el compartimento de reciclaje endocítico (CRE) de la célula están implicados en la salida de las partículas de HCV (Coller y col., 2012).

Conocer los diferentes eventos que tienen lugar durante el ensamblaje y la secreción de progenie viral ha sido posible a

través del establecimiento de sistemas de infección persistente basados en clones moleculares infecciosos (Zhong y col., 2006) (sección M2.3.3) y los sistemas de encapsidación de viriones infecciosos por trans-complementación (HCV_{TCP}) (Steinmann y col., 2008) (sección M4).

14.- Alteraciones del metabolismo de lípidos celular asociadas a la infección por HCV

La fuerte intersección existente entre la infección por HCV y la homeostasis lipídica de la célula contribuye al desarrollo de algunas de las patologías asociadas a dicha infección, como la esteatosis hepática (Syed, Amako, y Siddiqui 2010). La hepatoesteatosis o hígado graso consiste en la acumulación patológica de lípidos neutros en el parénquima hepático (Syed, Amako, y Siddiqui 2010). Se asocia frecuentemente (40%) con la infección por HCV, aunque puede tener otros orígenes, y favorece la progresión de fibrosis y carcinoma hepático en pacientes infectados (Ohata y col., 2003; Negro 2006). Su prevalencia y severidad es mayor en pacientes infectados por el genotipo 3, aunque se presenta en un 50% de las infecciones producidas por otros genotipos virales (Syed, Amako, y Siddiqui 2010).

Se ha visto que el desarrollo de hepatoesteatosis parece ser una consecuencia directa de la expresión de algunas proteínas de HCV, siendo la proteína core un actor principal (Syed, Amako, y Siddiqui 2010). Ensayos *in vitro* demostraron que la expresión de la proteína core correspondiente al genotipo 3 de HCV induce la aparición de esteatosis y la acumulación de LDs en la célula de una manera más acentuada que la proteína

core de otros genotipos (Abid y col., 2005; Piodi y col., 2008). Jhaveri y colaboradores, analizando muestras de pacientes infectados con el genotipo 3, mostraron la existencia de polimorfismos en la secuencia de la proteína core de este genotipo que correlacionan con la aparición de esteatosis (Jhaveri y col., 2008) explicando la mayor prevalencia de esta patología en los pacientes infectados con el genotipo 3 (Negro y Sanyal 2009).

En conjunto, la expresión de core parece favorecer la aparición de esteatosis porque promueve la formación de LDs y su acumulación en el parénquima hepático al inducir la lipogénesis *de novo*, favorecer la absorción de ácidos grasos y suprimir tanto su degradación como su secreción desde el hepatocito (Lerat y col., 2009; Negro y Sanyal 2009).

Core se localiza en la superficie de los LDs, principal reservorio de TAG de las células animales (Harris y Finck 2011), desde donde la proteína MTP los recluta y transfiere al lumen del RE para el ensamblaje de VLDL. Se ha visto que la expresión de core inhibe la actividad de la proteína MTP, impidiendo los procesos de ensamblaje y secreción de VLDL (Perlemuter y col., 2002). Asimismo, core es capaz de interferir con la actividad mitocondrial al promover la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) que, entre otros procesos, participan en la peroxidación de lípidos y proteínas estructurales como las implicadas en la maquinaria de secreción de VLDL (Okuda y col., 2002; Wang y col., 2010). Al bloquearse la secreción de VLDL, podría aumentar la acumulación intracelular de TAG y reducirse los niveles séricos de lipoproteínas y colesterol. Ello no sólo implica una mayor disponibilidad intracelular de lípidos para la formación de LDs y el desarrollo de esteatosis

sino también la aparición de otras dos patologías asociadas a la infección crónica por HCV, como son la hipobetalipoproteïnemia (bajos niveles séricos de lipoproteínas) y la hipocolesterolemia (bajos niveles séricos de colesterol) (Hofer y col., 2002).

Tanto en pacientes infectados con HCV como en cultivo celular, se ha visto que la expresión de core reduce los niveles de mensajero de PPAR α y de sus genes diana (Negro y Sanyal 2009). PPAR α es un receptor nuclear altamente expresado en hepatocitos que regula la expresión de genes implicados en la β -oxidación de ácidos grasos (Staels y col., 1998). Una disminución en los niveles de expresión de PPAR α reduce la degradación de ácidos grasos en la célula y contribuye a su acumulación en el parénquima hepático (Negro y Sanyal 2009). Sin embargo, existe controversia acerca del papel de PPAR α en el desarrollo de hepatoesteatosis ya que en ratones transgénicos se ha visto que su activación persistente, mediada también por core, conduce a una disfunción mitocondrial que acaba bloqueando la β -oxidación de ácidos grasos y favoreciendo su absorción (Tanaka y col., 2008). En ambos casos, el resultado es el mismo ya que hay un aumento en la acumulación intracelular de ácidos grasos que, al ser transformados en TAG, conduce al desarrollo de esteatosis hepática. No obstante, esta controversia plantea la existencia de un papel complejo para PPAR α en la patogénesis asociada a la infección por HCV (Tanaka y col., 2008).

A todo ello debemos sumar que la expresión de core promueve la síntesis *de novo* de ácidos grasos a través de la activación del factor de transcripción RXR α y de la enzima sintasa de ácidos grasos (FAS) (Tsutsumi y col., 2002). A través de su unión al

receptor X retinoide alfa (RXR α), core es capaz de activar proteolíticamente a la proteína SREBP-1c induciendo la expresión de genes implicados en la biosíntesis de colesterol y ácidos grasos (Syed, Amako, y Siddiqui 2010). De hecho, se ha observado que, en hígado de chimpancé, muchos de los genes regulados por SREBPs se inducen durante los estadios iniciales de la infección por HCV (Bigger y col., 2004; Su y col., 2002).

Por otro lado, se ha visto que, en cultivo celular, otras proteínas virales como NS2 o NS4B también pueden inducir la acumulación intracelular de LDs (Oem y col., 2008). Es probable, así, que la aparición de esteatosis en pacientes con HCV sea resultado de los efectos mediados por múltiples proteínas del virus.

Otro de los aspectos patológicos más evidentes de la infección por HCV tiene que ver con la proliferación de cisternas del RE que se observa en biopsias de hígado de pacientes infectados (Vasallo y Gastaminza 2015). Ésta se produce en respuesta a la situación de estrés que se dispara en la célula por la presencia del virus y que, entre otros factores, induce la expresión de XBP-1 (proteína 1 de unión a la X-box) que regula la biogénesis de RE y la lipogénesis hepática (Vasallo y Gastaminza 2015). Esta proliferación de las membranas del RE, como la que tiene lugar para la formación de las DMVs en las que se ensambla la replicasa viral (Romero-Brey y col., 2012) o en torno a los LDs implicados en el ensamblaje del virión (Miyanari y col., 2007), demanda una gran disponibilidad de lípidos a la célula hospedadora dado su papel estructural en la biogénesis de las mismas, de manera análoga a lo observado en otros virus RNA de polaridad positiva (Chuang y col., 2014).

En ese sentido, la familia de las lipinas, proteínas con actividad fosfatasa de ácido fosfatídico (PAP) (Reue y Brindley 2008), es particularmente interesante ya que se ha visto que juegan un papel central en la toma de decisiones de la célula acerca del destino de los lípidos de que dispone: biogénesis de membranas *versus* almacenamiento de los mismos en depósitos intracelulares (Chuang y col., 2014).

15.- La familia de las lipinas como moduladores del metabolismo de lípidos y lipoproteínas de la célula

Las lipinas son una familia de proteínas celulares que, en mamíferos, incluye tres miembros, LPIN1, LPIN2 y LPIN3. El miembro fundador de esta familia, LPIN1, se descubrió mediante técnicas de clonación posicional y se identificó como el producto de un gen mutado, *lpin1*, que provoca hígado graso tanto en ratón (*fld*) (Peterfy y col., 2001) como en humanos, concretamente, en niños (Valenti y col., 2012). Las lipinas LPIN2 y LPIN3 se identificaron, posteriormente, por su similitud con la secuencia proteica de LPIN1 (Peterfy y col., 2001).

Todos los miembros de esta familia presentan dos dominios cuya secuencia de aminoácidos se encuentra altamente conservada; se trata de los dominios N-LIP y C-LIP que aparecen en los extremos amino y carboxi-terminal de las lipinas, respectivamente (Peterfy y col., 2001). El dominio C-LIP contiene los motivos funcionales DXDXT, o motivo catalítico PAP, y LXXIL, o motivo de actividad transcripcional (Csaki y col., 2013). En el extremo amino-terminal de estas proteínas y muy cerca del

dominio N-LIP aparece la secuencia de localización nuclear (NLS) que es necesaria para la translocación de LPIN1 al núcleo y para la unión a su sustrato, el ácido fosfatídico (PA) (Ren y col., 2010) (Figura I3).

A pesar de la similitud que muestran en su secuencia, las lipinas presentan patrones de expresión tisular diferentes tanto en ratones como en humanos (Donkor y col., 2007) y están asociadas a enfermedades diferentes (Csaki y col., 2013). LPIN1 se expresa mayoritariamente en tejido adiposo y músculo esquelético con niveles de expresión reducidos en hígado mientras que LPIN2 se expresa, preferentemente, en hígado y cerebro. Los niveles de expresión de LPIN3 son, generalmente, muy inferiores a los de las otras lipinas aunque se expresa, sobre todo, en intestino (Donkor y col., 2007). La deficiencia en LPIN1 provoca lipodistrofia en ratones y está asociada al desarrollo de rabdomiomas y hepatoesteatosis pediátrica en humanos. La deficiencia en LPIN2, sin embargo, se asocia con la aparición de un síndrome raro conocido como síndrome de Majeed. No se tienen datos acerca de patologías asociadas a la deficiencia en LPIN3 (Csaki y col., 2013).

Aunque todas las lipinas presentan los motivos catalíticos DXDXT y LXXIL para funcionar, potencialmente, como enzimas PAP y reguladores transcripcionales, dadas estas circunstancias parece que, además de funciones solapantes en determinados tejidos, cada miembro de la familia podría desempeñar funciones únicas y específicas. En el caso de LPIN3, se conoce muy poco acerca de su función y modo de acción en cada tejido (Csaki y col., 2013). Hasta la fecha, la mayoría de estudios realizados acerca de la fisiología de esta familia de proteínas se han centrado

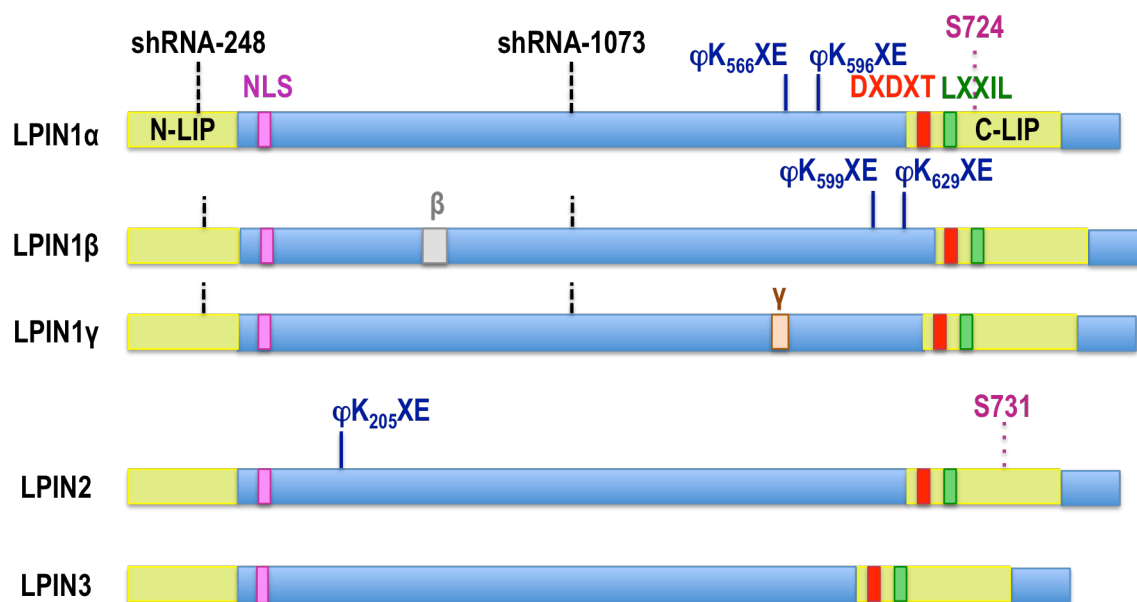


Figura I3. Motivos estructurales y funcionales de las lipinas. Diagrama esquemático de los distintos miembros de la familia de las lipinas en mamíferos. Se representan los dominios N-terminal (N-LIP) y C-terminal (C-LIP), la señal de localización nuclear (NLS), el motivo catalítico con actividad PAP (DXDXT) y el motivo de interacción con receptores nucleares (LXXIL). Se señalan motivos consenso de sumoilación (φKXE), donde X representa cualquier aminoácido y φ, aminoácidos hidrofóbicos. También se indican residuos conservados de serina que son necesarios para la actividad PAP de LPIN1α (S724) en ratones y de LPIN2 (S731). shRNA-248 y shRNA-1073 son los shRNAs empleados en nuestros ensayos de silenciamiento génico; se indican en la posición nucleotídica que reconocen en la secuencia de LPIN1. Las dianas de ambos shRNAs están presentes en todas las isoformas de LPIN1.

en LPIN1 (Harris y Finck 2011; Csaki y col., 2013).

I5.1.- Regulación de la expresión y actividad de LPIN1

La actividad de LPIN1 se encuentra regulada a múltiples niveles con objeto de responder a condiciones fisiológicas cambiantes en la célula. Los mecanismos implicados en la regulación de la expresión y actividad de LPIN1 incluyen transcripción génica, empalme alternativo del mRNA de LPIN1, modificaciones post-traduccionales de la proteína y cambios en su localización subcelular (Csaki y Reue 2010).

En adipocitos y hepatocitos, los

niveles de mRNA de LPIN1 se inducen en presencia de glucocorticoides (Manmontri y col., 2008; Zhang y col., 2008). De hecho, se ha observado que, *in vivo*, condiciones asociadas a altos niveles de glucocorticoides como la obesidad o el estado de ayuno también incrementan la transcripción del mRNA de LPIN1 (Zhang y col., 2008; Finck y col., 2006). En hígado, esta inducción es mediada por el factor de transcripción PGC-1α (coactivador 1 alfa del receptor gamma activado por proliferadores de peroxisomas) (Finck y col., 2006). Además, en células de hepatoblastoma se ha visto que la depleción de esteroides induce la expresión del mRNA de LPIN1 en un proceso regulado por SREBP-1 (Ishimoto y col., 2009). Reguladores negativos de la expresión de LPIN1 son las citoquinas y otros miembros

de la familia de las lipinas. Como veremos más adelante, hay evidencias de que LPIN1 y LPIN2 se regulan negativamente la una a la otra, tanto en cultivo celular como en modelos animales, con objeto de mantener la homeostasis lipídica de la célula (Csaki y Reue 2010; Dwyer J.R. 2012).

En humanos, el mRNA del gen *LPIN1* sufre empalme alternativo para generar tres isoformas, LPIN1 α , LPIN1 β y LPIN1 γ , que difieren en su secuencia de aminoácidos (aa). La secuencia de 890 aa de la isoforma LPIN1 α gana un exón de codificación de 33 aa en la isoforma LPIN1 β y de 26 aa en la isoforma LPIN1 γ ; la adición de este exón no afecta a ninguno de los motivos funcionales presentes en la secuencia de la proteína (Figura I3). No obstante, existen diferencias en cuanto a la localización subcelular y patrón de expresión tisular de las distintas isoformas que se traducen en diferencias funcionales entre las mismas (Peterfy, Phan, y Reue 2005).

La localización subcelular de las lipinas, que es determinante para su actividad funcional, se encuentra dinámicamente regulada por modificaciones post-traduccionales, principalmente fosforilación y sumoilación, que afectan a residuos muy concretos de su secuencia (Csaki y col., 2013). La hiperfosforilación de LPIN1 promueve su localización citosólica mientras que su estado defosforilado favorece su anclaje a la membrana del RE o a la membrana nuclear (Peterfy y col., 2010; Harris y col., 2007). El estado de fosforilación de LPIN1 no afecta a su actividad PAP pero sí a su capacidad para unirse al PA (Csaki y col., 2013). Aunque todas las isoformas de LPIN1 presentan la señal de localización nuclear pueden aparecer en compartimentos subcelulares distintos. En adipocitos, LPIN1 α aparece

predominantemente en núcleo mientras que LPIN1 β presenta una localización citoplásmica (Peterfy, Phan, y Reue 2005). En su estado fosforilado, LPIN1 y su actividad PAP residen en el citosol de la célula. En presencia de ácido oléico, LPIN1 se defosforila y mientras la isoforma LPIN1 α se transloca al núcleo para funcionar como coactivador transcripcional, la isoforma LPIN1 β queda retenida en la membrana del RE para desarrollar la actividad PAP (Peterfy y col., 2010; Harris y col., 2007; Huffman, Mothe-Satney, y Lawrence 2002). Mientras que LPIN1 α puede modificar su localización subcelular en respuesta a diferentes estímulos, LPIN1 β siempre aparece en el citoplasma sin posibilidad de translocarse al núcleo (Reue y col., 2000; Peterfy, Phan, y Reue 2005). Otra isoforma, LPIN1 γ , que se expresa principalmente en cerebro, aparece asociada a LDs (Wang y col., 2011). La sumoilación, por ejemplo, de LPIN1 α en células neuronales permite su translocación al núcleo y promueve su actividad transcripcional (Liu y Gerace 2009). Además, LPIN1 puede formar homo- y hetero-oligómeros con LPIN2 y LPIN3; se cree que esta capacidad puede influir en su localización subcelular y, por tanto, en su actividad (Csaki y col., 2013; Bou Khalil y col., 2010).

15.2.- Funciones moleculares de las lipinas

Las lipinas presentan un papel dual como moduladores de la biosíntesis de glicero- y fosfolípidos y del metabolismo de lipoproteínas. A través de su actividad como enzimas PAP controlan la biosíntesis de TAG y fosfolípidos y por su función como coactivador transcripcional regulan la expresión de genes implicados en el metabolismo hepático de

ácidos grasos y en los procesos de fosforilación oxidativa (Bou Khalil y col., 2010). La actividad PAP de las lipinas no es necesaria para su función como coactivador transcripcional por lo que se cree que ambas funciones moleculares son completamente separables (Finck y col., 2006; Kim y col., 2010).

15.2.1.- Función enzima fosfatasa de ácido fosfatídico (PAP)

La actividad catalítica PAP de las lipinas reside en su motivo DXDXT y es específica para PA. Estas proteínas se localizan en el citosol y se translocan a la membrana del RE en respuesta a niveles altos de ácidos grasos libres y a la fosforilación de algunos de sus residuos (Harris y col., 2007; Donkor y col., 2007). Una vez allí, tienen acceso al PA generado mediante acilación del glicerol-3-fosfato y lo defosforilan para su conversión a diacilglicerol (DAG), catalizando así el penúltimo paso en la biosíntesis de TAG y fosfolípidos, como la fosfatidilcolina (PC) y la fosfatidiletanolamina (PE) (Kennedy, Smith, y Weiss 1956). No obstante, el contenido en TAG y fosfolípidos de la célula no viene determinado únicamente por la actividad fosfatasa total debida a las lipinas ya que éstos también pueden originarse mediante hidrólisis y reesterificación de los TAG que se almacenan en el citoplasma de la célula a modo de LDs (Bou Khalil y col., 2010).

Al controlar la síntesis de TAG y fosfolípidos, LPIN1 no sólo gobierna el ensamblaje de las VLDL sino que también controla la función y dinámica de las membranas de RE y aparato de Golgi implicadas en su maduración, siendo difícil

discriminar la contribución relativa de las funciones PAP y transcripcional de LPIN1 a estos procesos (Bou Khalil y col., 2010; Reue y Dwyer 2009). LPIN1 juega, así, un papel central en el destino de TAG y fosfolípidos decidiendo acerca de su almacenamiento o dirigiéndolos hacia la biogénesis de membranas, principalmente, nuclear y de RE (Chuang y col., 2014). En ese sentido, se ha visto que LPIN1 estimula la síntesis de fosfolípidos y la expansión de las membranas del RE durante la diferenciación de linfocitos B (Fagone y col., 2007), indicando que el metabolismo de lípidos esta coordinado con la proliferación del RE (Bou Khalil y col., 2010). La deficiencia en el complejo *Pah1p/Smp2p*, homólogo de LPIN1 en levaduras, provoca una expansión masiva de la envuelta nuclear y una estructura anormal para las membranas nuclear y de RE debido a cambios en la regulación de enzimas clave en la biosíntesis de fosfolípidos así como a la falta de actividad PAP (Han, Siniosoglou, y Carman 2007). Además, el ortólogo de LPIN1 en *S.pombe* (Ned1p) interacciona con tres proteínas nucleares necesarias en la formación de la envuelta nuclear, lo que sugiere un papel relevante para LPIN1 en la morfología y biogénesis nuclear en este organismo (Tange, Hirata, y Niwa 2002).

LPIN1 es la principal responsable de la actividad PAP en tejido adiposo, músculo esquelético y sistema nervioso periférico de ratones, mientras que en el hígado la actividad PAP de LPIN1 es menos prevalente (Csaki y col., 2013). En ausencia de LPIN1, se observa que los niveles de actividad PAP en la célula son normales sugiriendo que los otros dos miembros de la familia de las lipinas, LPIN2 y LPIN3, podrían ejercer efectos compensatorios para el mantenimiento de la

homeostasis lipídica (Csaki y col., 2013; Donkor y col., 2007). En hígado, por ejemplo, la deficiencia en LPIN2 conduce a un incremento compensatorio en los niveles de proteína LPIN1 y en su actividad PAP. Existen, por tanto, interacciones funcionales *in vivo* entre los distintos miembros de la familia de las lipinas a fin de mantener la homeostasis lipídica celular (Dwyer J.R. 2012). A pesar de que todas las lipinas presentan actividad PAP, la contribución relativa de cada una de ellas varía en función del tipo celular (Bou Khalil y col., 2010).

15.2.2.- Función transcripcional

La actividad de las lipinas como regulador transcripcional reside en su motivo LXXIL a través del cual pueden interactuar con diferentes receptores nucleares y regular la expresión de sus genes diana. Los mecanismos que gobiernan la actividad transcripcional de LPIN1 varían con diferentes factores de transcripción; así, LPIN1 puede actuar como co-represor o co-activador de genes diferentes (Finck y col., 2006; Kim y col., 2010). Aunque todas las lipinas presentan el motivo LXXIL y la señal de localización nuclear, esta capacidad co-transcripcional sólo se ha demostrado *in vivo* para LPIN1 (Finck y col., 2006). En hepatocitos, LPIN1 puede interactuar directamente con el receptor nuclear PPAR α o, indirectamente, a través del complejo PGC-1 α -PPAR α para reprimir la expresión de genes implicados en lipogénesis (*SREBP-1*, *FASN*) e inducir la expresión de genes relacionados con el metabolismo oxidativo de ácidos grasos (PPAR α , *CPT1a* (gen codificante de la carnitina palmitoiltransferasa 1A)). A través de su interacción con PGC-1 α y

el receptor nuclear HFN4 α (Factor nuclear 4 alfa de hepatocito), LPIN1 regula el metabolismo hepático de lipoproteínas (Bou Khalil y col., 2010). En adipocitos, LPIN1 regula la expresión de factores de transcripción adipogénicos y de genes implicados en la síntesis de lípidos (*DGAT1*) favoreciendo su diferenciación y maduración (Finck y col., 2006; Bou Khalil y col., 2010). Además, LPIN1 inhibe la secreción de citoquinas en adipocitos (Kim y col., 2010) y está involucrada en la supervivencia y diferenciación de neuronas (Liu y Gerace 2009).

En resumen, las lipinas juegan un papel esencial en el control del metabolismo de lípidos (Bou Khalil y col., 2010) y en la gestión de los recursos disponibles en la célula, dirigiéndolos a su almacenamiento en forma de TAG o, por el contrario, a la biogénesis de membranas intracelulares mediante la síntesis de fosfolípidos (Chuang y col., 2014). Dada la fuerte intersección que existe entre el metabolismo de lípidos y lipoproteínas celular y el ciclo de vida de HCV, así como la implicación de dicho metabolismo en la patogénesis asociada a la infección, hemos considerado importante estudiar el papel que juega la familia de las lipinas en el ciclo de infección de HCV para evaluar su posible papel como mediador de la patogénesis y su potencial como diana para tratamientos antivirales basados en HTAs.

6. OBJETIVOS

El virus de la hepatitis C es el principal agente causal de enfermedad hepática grave a nivel mundial. Dado el elevado número de individuos crónicamente infectados por HCV y la existencia de una enorme constelación de secuencias virales circulando en todo el mundo, existe la necesidad de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas con actividad pangenotípica que limiten la aparición de mutantes resistentes, estén asociadas a un reducido número de efectos adversos y sean accesibles a la mayor parte de la población infectada. El objetivo final de esta Tesis Doctoral consiste en contribuir a la identificación y evaluación de nuevos fármacos y factores celulares que puedan ser empleados como diana en la terapia antiviral frente a la infección por HCV. Para ello se empleará, por un lado, un sistema de rastreo no sesgado para la identificación de nuevos fármacos que inhiben la infección por HCV y la evaluación de su potencial como agente antiviral. Por otro lado, se abordará la caracterización de LPIN1 como diana antiviral potencial, definiendo su implicación en la infección por el virus de la hepatitis C y en determinados mecanismos moleculares que subyacen a la patogénesis viral.

En este contexto, los objetivos específicos de esta Tesis Doctoral son los siguientes:

- 1. Identificación y evaluación de compuestos químicos previamente empleados en clínica para el tratamiento de patologías humanas como nuevos agentes antivirales frente a la infección por el virus de la hepatitis C.**
- 2. Caracterización de la función de LPIN1, factor regulador de la homeostasis celular de lípidos, en la infección por el virus de la hepatitis C.**

7. MATERIALES Y MÉTODOS

M1.- Líneas celulares humanas

La línea celular de hepatoma humano **Huh-7** (Nakabayashi y col., 1982) es la línea de referencia para el estudio de la infección por HCV en cultivo celular y se empleó en la mayoría de experimentos excepto en aquellos en que se indique lo contrario.

El clon celular **Huh-7.5** (Blight, McKeating, y Rice 2002) presenta una mayor permisividad para la replicación del virus de la hepatitis C que la línea parental Huh-7. Se trata de un clon celular derivado de la línea Huh-7 capaz de sostener la replicación de un replicón subgenómico del genotipo 1a que fue subsiguientemente curado con interferón alfa hasta erradicar cualquier RNA o proteína viral (Blight, McKeating, y Rice 2002). Este subclón se empleó en los ensayos de infección con la cepa TNcc del virus de la hepatitis C (genotipo 1a) dadas sus dificultades para replicar eficazmente en células Huh-7 (sección R2.3.2.1).

El clon celular **Huh-7.5.1 clon-2** (Pedersen y col., 2007) es hiper-permisivo para la replicación del virus de la hepatitis C lo que permite generar preparaciones de virus con mayor título en un tiempo menor. Proviene de un subclón celular (Huh-7.5.1) de la línea Huh-7.5 capaz de sostener la replicación de un replicón subgenómico del genotipo 1b que expresa la proteína de fusión NS5A-GFP y que fue subsiguientemente curado con interferón gamma hasta erradicar cualquier RNA o proteína viral (Zhong y col., 2005; Moradpour y col., 2004). El clon celular Huh-7.5.1 clon-2 se obtuvo tras curar con interferón gamma un subclón de Huh-7.5.1 que albergaba un replicón del genotipo 2a (Zhong y col., 2005).

Todas estas líneas celulares fueron cedidas por el Dr. Francis V. Chisari (TSRI, California, EEUU).

La línea celular **HEK293T** se empleó para los ensayos de transfección que se describen en la sección M5. Dicha línea, que proviene de riñón embrionario humano (Graham y col., 1977), fue cedida por el Dr. Juan Ortín (CNB, CSIC).

M1.1.- Cultivo de líneas celulares

Las líneas celulares Huh-7 y derivadas así como HEK293T se cultivaron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (*Gibco*) suplementado con HEPES 10mM, aminoácidos no esenciales al 1% (AANE) (*Gibco*), 100 UI/ml de penicilina/estreptomicina (*Gibco*) y 10% de suero bovino fetal (SBF) (*LINUS*) inactivado con calor (30 minutos (min) a 55°C). En adelante, esta solución de cultivo será referida como DMEMc.

En el caso de las líneas celulares transducidas con vectores lentivirales basados en pLKO.1 para la expresión de shRNAs (sección M.5.2), la solución de cultivo se suplementó con puromicina (*Sigma*) a una concentración final de 5 µg/ml.

Para el mantenimiento de las distintas líneas celulares se realizaron pases consecutivos cada 3-4 días, evitando la confluencia. Antes de ser levantadas, las células se lavaron una vez con PBS atemperado a fin de eliminar posibles restos de suero provenientes del medio de cultivo. A continuación, éstas se trataron con una solución al 0.5% de tripsina/EDTA 10x (*Gibco*) en el caso de las líneas Huh-7 y derivadas o

bien sólo con una solución al 0.02% de EDTA (*Millipore*) en el caso de la línea HEK293T.

Todas las líneas celulares se cultivaron a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂ y 98% de humedad.

M2.- Virus

M2.1.- Virus recombinantes de hepatitis C

Los virus de la hepatitis C aislados de pacientes no son infecciosos en modelos estándar de cultivo celular. No obstante, existe la posibilidad de producir virus infecciosos en células de hepatoma humano a partir de genomas virales completos clonados a partir de secuencias aisladas de pacientes y modificados genéticamente.

Los virus recombinantes que se han utilizado para el desarrollo de esta Tesis Doctoral son:

JFH1: Virus recombinante adaptado a cultivo celular obtenido a partir del clon infeccioso Japanese Fulminant Hepatitis-1 (JFH-1; genotipo 2a) (Kato y col., 2006) cedido por Takaji Wakita (Universidad de Tokyo). Puede ser propagado en células Huh-7 donde su infectividad, medida en unidades formadoras de focos por mililitro (uff/ml, del inglés ffu/ml), alcanza picos máximos de 10³–10⁴ ffu/ml (Zhong y col., 2005). Puede establecer infecciones persistentes durante varios meses sin producir efecto citopático (Pedersen y col., 2007; Kato y col., 2006; Zhong y col., 2006). Por este conjunto de características, el virus JFH-1 es una herramienta útil en ensayos de infección a baja multiplicidad y en el establecimiento de infecciones persistentes.

Los virus derivados de la cepa JFH-1 que también se han empleado en este trabajo son:

D183v: Virus adaptado a cultivo celular que se obtuvo mediante pases seriados del virus JFH-1 en células Huh-7.5.1 (Zhong y col., 2006). Presenta una elevada capacidad para replicar en células de hepatoma humano mostrando una cinética de expansión más rápida y picos de infectividad superiores a los de la cepa parental JFH-1 (1x10⁶ ffu/ml *versus* 1x10³ - 1x10⁴ ffu/ml). Estas características lo convierten en una herramienta útil en ensayos de infección de ciclo único. Cedido por Jin Zhong (Instituto Pasteur, Shanghai).

Virus quiméricos de hepatitis C: Los virus quiméricos recombinantes de hepatitis C resultan de fusionar en un único marco de lectura las secuencias codificantes de las proteínas estructurales (Core, E1, E2, p7 y parte de NS2) de los genotipos 1a (cepa H77) y 1b (aislado Con1) con las secuencias correspondientes al segundo dominio transmembrana de la proteína NS2 (C3) hasta el extremo C-terminal del genoma de JFH-1, incluyendo todos los elementos de su replicasa. Esta poliproteína quimérica se encuentra flanqueada por los extremos 5' y 3'-UTR de la cepa JFH-1. Los genomas que resultan de dicha fusión (H77C3-JFH1 y Con1C3-JFH1) dan lugar a viriones de distintos genotipos con una replicasa común, la del aislado JFH-1 (Pietschmann y col., 2006), por lo que resultan muy útiles en estudios comparativos de entrada, neutralización y ensamblaje viral.

TNcc (genotipo 1a): Virus recombinante adaptado a cultivo celular por

introducción de mutaciones adaptativas en el clon HC-TN (genotipo 1a) (Li Y 2012). Cedido por Jens Bukh (Hvidovre Hospital Copenhagen, Denmark). La transfección de este genoma recombinante produce virus infeccioso sólo en células Huh-7.5 con títulos de infectividad de aproximadamente 1×10^4 ffu/ml, si bien no llega a propagarse eficazmente en esta línea celular. Se empleó para validar los resultados obtenidos en infecciones realizadas con la cepa JFH-1 del genotipo 2a.

M2.2.- Producción de stocks de virus

M2.2.1.- Producción de virus infecciosos a partir de cDNA

Para la producción de virus recombinantes infecciosos los genomas virales se produjeron por transcripción *in vitro* de los cDNAs correspondientes (Tabla M1) y se electroporaron en células Huh-7.5.1 clon-2 y Huh-7.5 según correspondiese (sección M2.2.3).

M2.2.2.- Preparación de moldes de DNA y transcripción *in vitro* de genomas virales recombinantes

Los plásmidos empleados como molde para la transcripción de los genomas virales fueron digeridos durante 16 horas con 4 U/ μ g de los enzimas de restricción que se indican en la Tabla M1. Para la posterior purificación de los plásmidos, éstos se trataron con una mezcla de Proteinasa K (100 μ g/ml) en buffer TNE 1x (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl) al 0.5% SDS durante 1 hora a

50°C. A continuación, se llevaron a cabo dos rondas de extracción de DNA mezclando 1:1 el material digerido con proteinasa K con fenol-cloroformo a pH 7 y centrifugando las muestras durante 5 min a temperatura ambiente (TA) y 12000 rpm. Los sobrenadantes se trasvasaron a nuevos tubos para la siguiente ronda de extracción. Una vez centrifugadas las muestras, los sobrenadantes se mezclaron 1:1 con cloroformo y se volvieron a centrifugar durante 5 min a TA y 12000 rpm. Los sobrenadantes se trasvasaron a tubos nuevos, se mezclaron con 2.5 volúmenes de etanol al 100% y se incubaron durante 30 min a -20°C. Posteriormente, las muestras se centrifugaron durante 25 min a 4°C y 12000 rpm y los precipitados resultantes se sometieron a dos lavados con etanol al 75% en agua y luego, al 100%. Finalmente, los precipitados se dejaron secar a TA y se resuspendieron en 30 μ l de agua libre de nucleasas. La cuantificación de los plásmidos purificados se realizó midiendo su absorbancia a 260 nm. Éstos se conservaron a -20°C.

A continuación, se emplearon los moldes linearizados y purificados para una reacción de transcripción *in vitro* empleando el kit comercial Megascript T7 (Ambion, Paisley, UK). Los productos obtenidos se digirieron con DNasa, se precipitaron con cloruro de litio (7.5 M cloruro de litio en 50 mM EDTA), se lavaron con etanol al 75% en agua y luego, al 100% y, finalmente, se resuspendieron en agua libre de nucleasas (Zhong y col., 2005). La cuantificación de los RNAs obtenidos se realizó midiendo su absorbancia a 260 nm y su integridad se determinó mediante electroforesis de una pequeña muestra de los mismos en geles de agarosa (sección M8.2.).

Tabla M1. Plásmidos empleados en este trabajo

Nombre	Proteína / Construcción expresada	Sección en que se empleó	Referencia
pH77/C3-JFH1 ¹	Digerido con enzima XbaI (<i>Roche</i>) Genera cDNA quimera H77/C3-JFH1	M2.1-M2.2.2	(Pietschmann y col., 2006)
pCon1/C3-JFH1 ¹	Digerido con enzima XbaI (<i>Roche</i>) Genera cDNA quimera Con1/C3-JFH1	M2.1-M2.2.2	(Pietschmann y col., 2006)
pTNcc ¹	Digerido con enzima XbaI (<i>Roche</i>) Genera cDNA cepa TNcc	M2.1-M2.2.2	(Li Y 2012b)
pJFH1 ²	Digerido con enzima XbaI (<i>Roche</i>) Genera cDNA cepa JFH-1	M2.1-M2.2.2	(Kato y col., 2006)
pRenilla-Luc-null ³	Luciferasa (<i>Renilla</i>)	M3	CLONTECH
pcDNA3 DcE1E2 ⁴	Glicoproteínas E1E2 de HCV (cepa JFH1, genotipo 2a)	M5.1	(Bartosch, Dubuisson, y Cosset 2003)
pUKN1B 12.6 (GM6) ⁴	Glicoproteínas E1E2 de HCV (aislado genotipo 1b)	M5.1	(Lavillette y col., 2005)
pUKN2A 2.4 (BE4) ⁴	Glicoproteínas E1E2 de HCV (aislado genotipo 2a)	M5.1	(Lavillette y col., 2005)
pUKN2B 2.8 (PL8) ⁴	Glicoproteínas E1E2 de HCV (aislado genotipo 2b)	M5.1	(Lavillette y col., 2005)
pUKN3A 1.28 (P59.6) ⁴	Glicoproteínas E1E2 de HCV (aislado genotipo 3a)	M5.1	(Lavillette y col., 2005)
pUKN4 11.1 ⁴	Glicoproteínas E1E2 de HCV (aislado genotipo 4)	M5.1	(Lavillette y col., 2005)
pUKN5 14.4 ⁴	Glicoproteínas E1E2 de HCV (aislado genotipo 5)	M5.1	(Lavillette y col., 2005)
phCMV-RD114 ⁴	Glicoproteína de la envuelta del virus de la leucemia felina	M5.1	(Bartosch, Dubuisson, y Cosset 2003)
phCMV-HA ⁴	Hemaglutinina (HA) del virus de la gripe aviar (cepa H7N1)	M5.1	Cedido por F.L. Cosset (INSERM, Lyon)
pMD2.G ⁵	Proteína G de VSV	M5.2	Addgene 12259
pRSV-Rev ⁵	Proteína Rev de HIV-1	M5.2	Addgene 12253 (Dull y col., 1998)
pMDLg/pRRE ⁵	Proteínas Gag y Pol de HIV-1	M5.2	Addgene 12251 (Dull y col., 1998)

Tabla M1. Plásmidos empleados en este trabajo (continuación)

Nombre	Proteína / Construcción expresada	Sección en que se empleó	Referencia
pLKO.1 shRNA-248 LPIN1 ⁶	shRNA-248-LPIN1 y gen de resistencia a puromicina	M5.2	Sigma Aldrich
pLKO.1 shRNA-1073 LPIN1 ⁶	shRNA-1073- LPIN1 y gen de resistencia a puromicina	M5.2	Sigma Aldrich
pGemT-GAPDH ⁶	Amplicón de GAPDH	M9.2	-
pGemT-HCV T7 antisense ⁶	Amplicón de HCV	M9.2	-
pDONR221- LPIN1	cDNA LPIN1 y gen de resistencia a kanamicina	M9.2	DNASU

¹Cedido por Jens Bukh (Hvidovre Hospital Copenhagen, Denmark)

²Cedido por T. Wakita (Universidad de Tokyo)

³Cedido por Juan Ortín (CNB, CSIC)

⁴Cedido por F. L. Cosset (INSERM, Lyon)

⁵Cedido por D. Trono (EPFL, Lausanne)

⁶Generado en el laboratorio de P. Gastaminza

M2.2.3.- Electroporación

Para la electroporación de células con un RNA transcrito *in vitro* (IVT), éstas se levantaron con una solución al 0.5% de tripsina/EDTA, se resuspendieron en DMEMc hasta obtener una suspensión celular homogénea y se lavaron con PBS. Las células se resuspendieron en Citomix (120 mM KCl, 0.15 mM CaCl₂, 10 mM K₂HPO₄/ KH₂PO₄ pH 7.6, 25 mM HEPES, 2 mM EGTA, 5 mM MgCl₂, H₂O, pH 7.6) suplementado con 5 mM glutatión (dilución 1:20 de un stock de glutatión 100 mM en H₂O, pH 7.6) a una concentración de 1x10⁷ células/ml. A continuación, se mezclaron 10 µg de RNA IVT (1 µg de RNA IVT por cada 1x10⁶ células a electroporar) en 0.4 ml de la suspensión celular anterior. La mezcla resultante se transfirió a una cubeta de electroporación de 4 mm (*Biorad*) y se conservó en hielo hasta someterla a un pulso de 0.27 kV, 100 Ohms y 960 µF en un sistema Gene Pulser de *Bio-Rad*.

Inmediatamente después del pulso, las células se mantuvieron a 4°C durante 10 min para trasvasarse, finalmente, a una botella T75 de tapón con filtro (*Corning*) en 15 ml de DMEMc e incubarse a 37°C. En este punto, los cultivos celulares se llevaron a un laboratorio de nivel 3 de contención biológica.

En el caso de los virus JFH-1 y quimeras, el RNA IVT se electroporó en células Huh-7.5.1 clon-2 mientras que para el virus TNcc se emplearon células Huh-7.5.

A distintos tiempos post-electroporación (días 3, 6 y 9 para JFH-1 y los virus quimera y días 2, 3, 4 y 8 para el virus TNcc), se recogieron sobrenadantes que se conservaron alicuoteados a -80°C y se reposó el medio de cultivo para su incubación a 37°C hasta el siguiente punto de recogida.

Para determinar la eficiencia de electroporación, además de medir la infectividad del sobrenadante a distintos tiempos post-transfección (sección M2.2.4), se tomaron muestras de las distintas líneas

celulares y se analizaron mediante inmunofluorescencia a días 3 y 9 post-electroporación en el caso de JFH-1 y los virus quimera y a día 2, en el caso de la cepa TNcc (sección M2.2.4).

M2.2.4.- Titulación mediante dilución límite, inmunofluorescencia y recuento de focos de infección.

La titulación de stocks de virus y muestras inoculadas con el virus de la hepatitis C se llevó a cabo mediante dilución límite y análisis de formación de focos de infección por inmunomicroscopía de fluorescencia. Cada foco de infección se atribuye a una única partícula infecciosa, también definida como unidad formadora de focos. El número de focos de infección obtenido por inoculación de células *naïve* con diluciones seriadas de una misma muestra se usa para determinar el título de infectividad asociado a dicha muestra.

Para determinar la infectividad de una muestra, se sembraron células Huh-7.5.1 clon-2 en un formato de placa multipocillo Mw96 (1×10^4 células por pocillo), en triplicado para cada muestra, y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Se prepararon diluciones seriadas (1:5) de las muestras infecciosas y las células se inocularon con 100 μ l de cada dilución para incubarse a 37°C durante 72 horas. Las células se fijaron durante 20 min a TA con una solución de formaldehído al 4% en PBS y se lavaron dos veces con PBS.

Para permeabilizar las células, éstas se incubaron a TA durante 1 hora con 30 μ l de buffer de incubación (3% de BSA, 0.3% de Tritón X-100 diluidos en PBS) y, a continuación, con 25 μ l de una dilución a 1

μ g/ml del anticuerpo primario anti-E2 AR3A (anti-core (C7-50) para la cepa TNcc) (Tabla M2) en buffer de unión (3% de BSA, 0.3% de Tritón X-100 diluidos en PBS) a TA y durante 1 hora. Tras dos lavados con 200 μ l de PBS, las células se incubaron con 25 μ l de una dilución 1:500 en buffer de unión del anticuerpo secundario correspondiente conjugado al fluoróforo Alexa 555 (Alexa 594, en el caso de la cepa TNcc) (Tabla M2). Esta dilución de anticuerpo también incluía el reactivo 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI) a 1 μ g/ml para teñir los núcleos celulares. Las células se lavaron dos veces con 200 μ l de PBS y se conservaron en 50 μ l de PBS a 4°C hasta ser analizadas por microscopía de fluorescencia. Esta misma metodología se empleó en el análisis de proteínas virales como medida de eficiencia en los ensayos de electroporación (sección M2.2.3) y para verificar el establecimiento de una infección persistente por el virus de la hepatitis C (ver sección M2.3.3).

Las muestras se analizaron en un microscopio de fluorescencia Leica (DMI 6000B) acoplado a una cámara digital (Orca R2) mediante recuento del número de focos de infección. Sólo se consideraron aquellas diluciones en las que los focos de infección se distinguían como unidades discretas hasta llegar a la dilución que resulta negativa para la formación de dichos focos (dilución límite).

El título de infectividad (en ffu/ml) de cada muestra se calculó multiplicando el número de focos de infección de cada pocillo por su correspondiente factor de dilución. El valor resultante se multiplicó por 10 para obtener el número de focos por ml (ya que se usaron 100 μ l para la titulación). A continuación, se promedió el título de infectividad estimado para las diferentes

diluciones y el título de infectividad estimado para cada triplicado.

M2.2.5.- Producción de stocks de virus por propagación de virus infeccioso

Todos los ensayos de infección con el virus de la hepatitis C se realizaron en un

Tabla M2. Anticuerpos utilizados en este trabajo

Anticuerpo ^(a)	Especie ^(b)	Procedencia ^(c)	Referencia ^(d)	Diluciones de trabajo ^(e)		
				WB	IF	ELISA
Acm anti-LPIN1 (B-12)	Ratón	S Cruz Biotech.	sc-376874	1:100	-	-
Acm anti-Actina	Ratón	Sigma	ab8226	1:5000	-	-
Acp anti-apoB	Cabra	Abcam	ab7616	1:1000	-	-
Acm anti- α 1AT	Ratón	Abcam	ab9399	1:1000	-	-
Acp anti-GFP	Conejo	NOVUS Biologicals	NB600-308SS	1:1000	-	-
Acm anti-Core (C7-50)	Ratón	Thermo Scientific	MA1-080	-	1:500	-
Acm anti-E2 (AR3A)	Humano	Dr. Mansun Law	(Law y col., 2008)	-	1:1000	1:1000
Acm anti-NS3 (C2E3)	Ratón	Biofront Technologies	HCV-2E3	1:5000	1:500	-
Anti-ratón IgG-peroxidasa	Cabra	Biorad	170-6516	**	-	-
Anti-conejo IgG peroxidasa	Cabra	Sigma	A9169	1:40000	-	-
Anti-cabra IgG peroxidasa	Conejo	Sigma	A5420	1:20000	-	-
Anti-humano IgG peroxidasa	Cabra	Thermo Scientific	#31410	-	-	1:10000 - 1:15000* **
Anti-humano IgG Alexa 555	Cabra	Invitrogen	A21433	-	1:500	-
Anti-ratón IgG Alexa 594	Cabra	Invitrogen	A11032	-	1:500	-

(a) Acm, Anticuerpo monoclonal; Acp, Anticuerpo policlonal

(b) Especie animal en la que se generó el anticuerpo

(c) Casas comerciales o laboratorios de donde se obtuvieron los anticuerpos. Dr. Mansun Law, The Scripps Research Institute, La Jolla, California, EEUU.

(d) Referencia del anticuerpo asignada por la casa comercial

(e) Se indica la técnica en la que se utilizan los anticuerpos y la dilución de trabajo. WB, Western Blot; IF, Inmunofluorescencia; ELISA, Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

**Dilución variable en función del anticuerpo primario al que se uniera (1:3000 para α 1AT, 1:5000 para LPIN1 y 1:20000 para Actina y NS3)

*** La dilución varía en función del lote.

laboratorio de nivel 3 de contención biológica.

Para la producción de stocks de virus (JFH-1 y D183v), los sobrenadantes infecciosos generados por electroporación se diluyeron en DMEMc hasta obtener una MDI de 0.01 y se utilizaron para inocular células *naïve* (Huh-7.5.1 clon-2) sembradas a una densidad de $4,5 \times 10^6$ células en una botella T162 de tapón con filtro (*Corning*). En el caso de JFH-1, a día 3 post-infección, las células se levantaron con 1 ml de una solución al 0.5% de tripsina/EDTA y se resuspendieron en 9 ml de DMEMc; esta mezcla se llevó a un volumen final de 60 ml con DMEMc y se repartió en tres botellas T162 idénticas a la anterior que se incubaron a 37°C durante 72 horas. Durante los días de máxima producción viral (días 6-9 para JFH-1 y días 3-6 para D183v), los sobrenadantes se recogieron diariamente y se centrifugaron durante 5 min a 4000 rpm para eliminar posibles restos celulares. Éstos se conservaron en alícuotas a -80°C.

En el caso de la cepa TNcc, los sobrenadantes generados por electroporación se usaron directamente para ensayos de infección ya que este virus no se puede propagar en cultivo.

M2.3.- Ensayos de infección con el virus de la hepatitis C

M2.3.1.- Infección de ciclo único

Para llevar a cabo una infección de ciclo único se sembraron, en triplicado, células Huh-7 en un formato de placa multipocillo Mw24, a una densidad de 5×10^4 células por pocillo, y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Al día siguiente, las células se inocul aron con el stock de D183v diluido en

DMEMc hasta obtener una MDI de 10 y se incubaron a 37°C. Tras 5 horas de adsorción, se retiró el inóculo y las células se lavaron dos veces con PBS atemperado. Salvo en el caso de las células que fueron procesadas a 5 horas post-infección (hpi), al resto se les añadió 500 µl de DMEMc para su incubación a 37°C durante 24, 48 y 72 horas.

Con objeto de determinar los niveles de RNA viral parental, las células correspondientes al punto de recogida de 5 hpi se resuspendieron en 500 µl de isotiocianato de guanidinio (GTC) y se almacenaron a -80°C hasta ser procesadas según se describe en la sección M9.1.

Para analizar tanto la producción de virus progenie como la acumulación intracelular de RNA viral durante la infección, las muestras correspondientes a los tiempos 24, 48 y 72 hpi se procesaron como se indica a continuación. Para determinar los títulos de infectividad extracelular, se recogieron los distintos sobrenadantes y se titularon mediante dilución límite e inmunomicroscopía de fluorescencia (sección M2.2.4). A continuación, las células se lavaron con PBS atemperado, se levantaron con 100 µl de una solución al 0.5% de tripsina/EDTA y se resuspendieron en 500 µl de DMEMc. Así, de los 600 µl de suspensión celular anteriores se trasvasaron 5/6 a un tubo de 1.5 ml para determinar la infectividad intracelular según se describe en (Gastaminza, Kapadia, y Chisari 2006) y el resto se resuspendió en 400 µl de GTC para la extracción de RNA intracelular según se indica en la sección M9.1. Todas las muestras se conservaron a -80°C hasta su análisis.

M2.3.2.- Infección de ciclo múltiple para evaluación de compuestos antivirales

Para llevar a cabo una infección de ciclo múltiple, en los ensayos relativos al análisis de compuestos de la quimioteca del NIH (secciones R.1.2 y R1.6), se sembraron células Huh-7.5.1 clon-2 en un formato de placa multipocillo Mw6 (5×10^5 células por pocillo), en triplicados para cada muestra, y en un volumen final de 2 ml y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Se prepararon stocks de cada compuesto a una concentración que era dos veces la establecida en la sección R1.2. Las células se inocularon con una mezcla 1:1 del stock de virus (JFH-1 o virus quimera, según las características de cada ensayo; MDI de 0.01 o 0.005, respectivamente) y la dilución correspondiente de cada compuesto, de manera que la concentración final de cada uno de ellos fuera la que se indica en la sección R1.2. Se incluyó DMSO como control (vehículo). Las células se incubaron a 37°C durante 3 días, se levantaron con una solución al 0.5% de tripsina/EDTA, se diluyeron en DMEMc suplementado con las concentraciones anteriormente indicadas para cada uno de los compuestos y, nuevamente, se sembraron en pocillos de Mw6 en proporción 1:3. A continuación, se incubaron a 37°C durante 3 días. Las células se resuspendieron directamente en 500 µl de GTC y se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento para determinar los niveles de RNA viral según se describe en la sección M9.

M2.3.2.1.- Infección con la cepa TNcc del genotipo 1a

Los experimentos de infección con la cepa TNcc del genotipo 1a del virus de la

hepatitis C se realizaron a baja multiplicidad de infección (MDI de 0.005). Para ello, se sembraron células Huh-7.5 en un formato de placa multipocillo Mw24 (5×10^4 células por pocillo), en triplicados, y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Las células se inocularon a una MDI de 0.005 y se incubaron a 37°C durante 72 horas. Dado el bajo nivel de replicación de TNcc, se incluyó un control de células infectadas tratadas con el inhibidor de replicación 2-C-metiladenosina (Carroll y col., 2003) (2mAde; 10 µM) para distinguir el RNA parental del RNA derivado de replicación. A continuación, las células se lavaron con PBS, se resuspendieron en 500 µl de GTC y se almacenaron a -80°C hasta ser procesadas según se describe en la sección M9.1. El análisis de los niveles de RNA viral intracelular se llevó a cabo mediante RT-PCR cuantitativa (sección M9.2).

M2.3.3.- Infección persistente

Para el establecimiento de una infección persistente por el virus de la hepatitis C se sembraron células Huh-7 en una botella T75 de tapón con filtro (*Corning*) a una densidad de 2×10^6 células y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Al día siguiente, las células se inocularon con el stock de JFH-1 diluido en DMEMc hasta obtener una MDI de 0.01 en un volumen final de 10 ml y se incubaron a 37°C durante 13-14 días. Con objeto de mantener las células en subconfluencia y asegurar la progresión de la infección, éstas se propagaron cada 3 días. A día 13-14 post-inoculación, los cultivos muestran una reducción visible en su capacidad de proliferación ya que la infección se ha propagado a todas las células, tal y como se

verifica mediante microscopía de inmunofluorescencia (sección M2.2.4) (Zhong y col., 2006). A partir de este punto, las células se cultivaron como las Huh-7 (sección M1.1) durante un periodo máximo aproximado de cuarenta días.

Para los estudios de silenciamiento génico en cultivos de células persistentemente infectadas (sección R2.7), se sembraron 2×10^5 células por pocillo de una placa multipocillo Mw6, en duplicados para cada muestra, y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Las células se transdujeron con las construcciones lentivirales generadas en la sección M5.2. A días 7, 10 y 13 post-transducción, las células se lavaron con PBS atemperado, se levantaron con una solución al 0.5% de tripsina/EDTA y se resuspendieron en DMEMc para proceder a su recuento. Las células se sembraron en distintos formatos de placa multipocillo dependiendo del parámetro a analizar. Para evaluar infectividad extracelular y RNA viral intracelular se sembraron, en triplicado, 1×10^5 células por pocillo de Mw24 que se incubaron a 37°C durante 24 horas. Para mantenimiento de las líneas celulares se sembraron 4×10^5 células en un único pocillo de Mw6 y, para la obtención de extractos de proteína total con objeto de analizar el silenciamiento génico mediante Western Blot (sección M10), 8×10^5 células por pocillo de Mw6. En todos los casos, las células se incubaron a 37°C durante 24 horas y se procesaron según se describe en la sección M2.3.1. Las muestras generadas se conservaron a -80°C hasta su análisis.

Para el estudio de la colección de compuestos químicos que se describe en la sección R1.4 y una vez establecida la infección persistente, se sembraron células en formato de placa multipocillo Mw24, en triplicado para cada muestra, y a una densidad de 1×10^5

células por pocillo. Estas células se trataron durante 48 horas con los compuestos seleccionados y, a continuación, se determinaron los títulos de infectividad del virus progenie mediante dilución límite, inmunofluorescencia y recuento de focos de infección (sección M2.2.4) así como la carga de RNA viral mediante RT-PCR cuantitativa (sección M9.2).

M2.4.- Coronavirus humano 229E-GFP

Para el desarrollo de esta Tesis Doctoral, además de los diferentes clones y virus recombinantes de hepatitis C que se han descrito en secciones anteriores, también se empleó el coronavirus (CoV) humano 229E-GFP. Se trata de una cepa recombinante que expresa la proteína GFP bajo el control del elemento regulador de la transcripción de coronavirus (Thiel y col., 2001). Fue cedido por Volker Thiel (University of Bern, Switzerland).

M2.4.1.- Generación de stocks del coronavirus humano 229E-GFP

Para la generación de stocks del CoV humano 229E-GFP (Thiel y col., 2001) se inocularon, a una MDI de 0.01, monocapas subconfluentes de células Huh-7 sembradas en una botella T75 ($3,5 \times 10^6$ células) y se recogieron sobrenadantes a 48 y 72 hpi. Estos sobrenadantes se centrifugaron a 4000 rpm durante 5 min y, tras eliminar los restos celulares, se alicuotearon y almacenaron a -80°C hasta su titulación según se describe en la sección M2.4.3.

M2.4.2.- Infección y producción de virus progenie por el coronavirus humano 229E-GFP

Las infecciones con el CoV humano 229E-GFP se realizaron en monocapas subconfluentes de células Huh-7 que se sembraron en formato de placa multipocillo Mw96 (1×10^4 células por pocillo), en triplicado para cada muestra. Se incubaron a 37°C durante 24 horas. Al día siguiente, las células se inocularon con diluciones seriadas (1:3) en DMEMc del stock de CoV generado en la sección M2.4.1 y se incubaron a 37°C durante 48 horas. Las células se fijaron con una solución de formaldehído al 4% en PBS durante 20 min a TA y se lavaron dos veces con PBS. Para determinar la eficiencia relativa de infección se siguió la metodología descrita en la sección M2.4.3.

Para determinar la capacidad de propagación del virus, se sembraron células Huh-7 en un formato de placa multipocillo Mw24 (5×10^4 células por pocillo), en triplicado para cada muestra, y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Las células se inocularon con el CoV humano 229E-GFP a una MDI de 0.01 y se incubaron a 37°C durante 24 horas. A continuación, las células se lavaron dos veces con PBS atemperado y se incubaron en un volumen final de 500 μ l de DMEMc, a 37°C, durante 48 horas. Se recogieron los sobrenadantes para su titulación según la metodología descrita en la sección M2.4.3.

M2.4.3.- Titulación del coronavirus humano 229E-GFP mediante dilución límite, inmunofluorescencia y recuento de focos de infección

Para la titulación de stocks y/o muestras inoculadas con el CoV humano 229E-GFP se siguió una variante de la metodología descrita en la sección M2.2.4. Una vez realizada la titulación, las muestras se fijaron con formaldehído al 4% en PBS y, directamente, se analizó la señal de GFP de cada una de ellas mediante inmunomicroscopía de fluorescencia y recuento del número de focos de infección (ver sección M2.2.4).

M3.- Ensayos de replicación transitoria por transfección de RNAs virales subgenómicos

Para determinar la eficiencia de traducción primaria y replicación en ausencia de infección, se emplearon ensayos sustitutivos basados en replicones subgenómicos (SGR) dicistrónicos del virus de la hepatitis C:

SGR-JFH1-luc: replicón subgenómico basado en la secuencia consenso de la cepa JFH-1 del virus de la hepatitis C (genotipo 2a) (Kato y col., 2003) que consta de dos cistrones: el primero, que contiene el IRES de HCV para la traducción de un gen reportero de luciferasa (*Photynus pyralis*) y el segundo, que contiene el IRES del virus de la encefalomiocarditis (ECMV) para la traducción de las proteínas no estructurales (NS3-NS5B) y las secuencias 3'UTR del virus de la hepatitis C que, junto con las secuencias 5'UTR presentes en el primer cistron, permiten la replicación

del minigenoma. Se ha empleado en estudios relativos a la replicación del genotipo 2a de HCV. Cedido por Ralf Barstenschlager.

SGR-JFH1-luc-ΔGND: replicón subgenómico similar al SGR-JFH1-luc aunque portador de una mutación puntual (GDD > GND) a nivel del motivo catalítico de la proteína NS5B que lo hace defectivo en replicación (Kato y col., 2003). En este caso, el gen *luc* de *Photynus* ha sido sustituido por el de *Renilla*. Este replicón se ha empleado en estudios de traducción primaria. Cedido por Frank Chisari.

Ambos replicones se generaron mediante transcripción *in vitro* de los cDNAs correspondientes (Tabla M1). Los RNAs resultantes se transfectaron en células Huh-7 con *Lipofectamina 2000* (Invitrogen) siguiendo las recomendaciones del proveedor. Para un formato de placa multipocillo Mw96 (2x10⁴ células por pocillo), la mezcla de transfección se preparó como una dilución 1:100 de *Lipofectamine 2000* en *OPTIMEM* (Gibco) y 100 ng de RNA viral. A 5 hpt la mezcla de transfección se reemplazó por DMEMc. Las células se incubaron a 37°C durante un tiempo que varió en función de las características del ensayo.

En los ensayos de replicación del SGR-JFH1 relativos al análisis de compuestos de la quimioteca del NIH (sección R1.3), se electroporaron células Huh-7 con 5 µg del RNA IVT correspondiente (Tabla M1). El procedimiento que se siguió para dicha electroporación es idéntico al descrito en la sección M2.2.3. Una vez electroporadas, las células se sembraron en formato de placa multipocillo Mw96 (2x10⁴ células por pocillo),

en duplicados por condición experimental, y se incubaron a 37°C durante 5 horas. A continuación, las células se incubaron con la dilución correspondiente de cada compuesto a 37°C durante 24 horas. Los niveles de actividad luciferasa (*Photynus*) se determinaron a 24 horas post-electroporación (hpe) según se describe en la sección M6.

M4.- Partículas transcomplementadas de hepatitis C (HCV_{TCPs})

Las partículas transcomplementadas de hepatitis C (HCV_{TCPs}) son partículas virales auténticas que portan un genoma defectivo que impide su propagación y que, por tanto, recapitulan un único ciclo de infección. Las HCV_{TCPs} representan una herramienta muy útil en el estudio de aspectos tempranos de la infección con el virus de la hepatitis C (entrada viral, traducción y replicación del RNA viral) en laboratorios con nivel de bioseguridad 2.

Para la producción de HCV_{TCPs} se generaron líneas celulares empaquetadoras Huh-7.5.1 clon-2 que expresan las proteínas virales core-E1 y E2-p7-NS2 a partir de dos construcciones lentivirales integradas por transducción. Estas células fueron electroporadas con el RNA transcrito *in vitro* del replicón SGR-JFH1-luc según se describe en (Steinmann y col., 2008). Los sobrenadantes infecciosos de las células electroporadas se recogieron a 24, 48, 72 y 96 hpe y se filtraron con un tamaño de poro de 0.45 µm.

Para verificar la infectividad de las HCV_{TCPs} generadas, se sembraron células Huh-7, en triplicado y en un formato de placa multipocillo Mw96 (1x10⁴ células por pocillo), y al día siguiente se inocularon con 200 µl de

cada stock de sobrenadante. Las células se incubaron a 37°C durante 48-72 horas. La infectividad de los sobrenadantes se determinó midiendo los niveles de actividad luciferasa según se describe en la sección M6.

M5.- Vectores retrovirales

Para el desarrollo de esta Tesis Doctoral se han empleado dos tipos de vectores retrovirales: uno, basado en el empleo de secuencias reguladoras procedentes del virus de la leucemia murina (MLV) para la generación de partículas retrovirales pseudotipadas (sección M5.1) y otro, basado en el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV-I) para la construcción de vectores lentivirales que expresan silenciadores tipo shRNA (sección M5.2).

Ambos tipos de vectores se generaron mediante co-transfección de plásmidos con fosfato cálcico en cultivos subconfluentes de células HEK293T (Wigler y col., 1979). Brevemente, el medio de cultivo se reemplazó por DMEMc sin antibióticos y las células se incubaron a 37°C durante 4 horas. Para la transfección de 3×10^6 células, se mezclaron 20-30 µg de los diferentes DNAs (según se tratase de la producción de partículas retrovirales pseudotipadas o vectores lentivirales, respectivamente) en 500 µl de CaCl_2 a 250 mM. La mezcla, que se añadió gota a gota sobre 500 µl de HBS 2x (280 mM NaCl, 10 mM KCl, 1.5 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 12 mM D-Glucosa, 50 mM HEPES pH 7.3, pH 7.05), se incubó a TA durante 1 min. A continuación, ésta se añadió gota a gota sobre el cultivo celular que se incubó a 37°C durante 12-16 horas. Pasado este tiempo, la solución

de transfección se reemplazó por DMEMc y las células se incubaron a 37°C durante 24 horas. Se recogieron los sobrenadantes, se filtraron (tamaño de poro 0.45 µm) y se almacenaron como alícuotas de trabajo a -80°C.

M5.1.- Partículas pseudotipadas

Entendemos por partícula pseudotipada (o pseudopartícula) una partícula retroviral que expresa ectópicamente las glicoproteínas de la envuelta de un determinado virus y cuyo genoma, que codifica un gen reportero de luciferasa (*Firefly*), está regulado por secuencias que proceden del virus de la leucemia murina. El sistema de infección basado en el empleo de pseudopartículas se ha utilizado para estudiar aspectos relacionados con las funciones específicas de las glicoproteínas de la envuelta viral a nivel del proceso de entrada del virus.

En la Tabla M3 se indican los distintos tipos de pseudopartículas que se emplearon en este trabajo. Estas pseudopartículas se generaron a partir de los reactivos cedidos por F. L. Cosset (INSERM-Lyon, Francia) (Tabla M1) siguiendo la metodología descrita anteriormente. La única modificación respecto de dicho procedimiento alude a la naturaleza de la mezcla de plásmidos que se utilizó y que incluyó 8 µg del plásmido pTG5349 (Gag-Pol MLV), 8 µg del plásmido pMLV-Firefly-Luc y 5 µg de la construcción plasmídica que expresa las glicoproteínas de la envuelta de las distintas cepas de hepatitis C, gripe o del retrovirus felino RD114 o 3 µg, en el caso del plásmido que expresa la proteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV).

Tabla M3. Partículas retrovirales pseudotipadas generadas y empleadas en este trabajo

Tipo	Virus	Proteínas de la envuelta	Genotipo/Cepa
HCV _{pp}	Hepatitis C	E1E2	1a , 1b, 2a (aislado UKN2A 2.4 y cepa JFH-1), 2b, 3, 4 y 5
VSV _{pp}	Virus de la estomatitis vesicular	G	
RD114	Retrovirus endógeno felino	RD114	
FLU	Virus de la gripe	Hemaglutinina (HA) y Neuraminidasa (NA)	H7N1 (cepa aviar)

Todos los stocks de pseudopartículas que expresan las glicoproteínas de la envuelta del virus de la hepatitis C (HCV_{pp}) se conservaron a 4°C hasta su utilización ya que mostraron una gran sensibilidad a los ciclos de congelación-descongelación.

Para evaluar la infectividad de estas pseudopartículas, se sembraron células Huh-7 en un formato de placa multipocillo Mw96 (1x10⁴ células por pocillo), en triplicado para cada stock, y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Al día siguiente, las células se inocularon con 200 µl de cada stock y se incubaron a 37°C durante 72 horas. Los títulos de infectividad se determinaron midiendo los niveles de actividad luciferasa según se describe en la sección M6.

Para los ensayos de infección con pseudopartículas se empleó el mismo procedimiento que para su titulación, excepto en los experimentos de inhibición farmacológica (sección R1.5) en los que las HCV_{pp} se mezclaron 1:1 con una solución 2x de la concentración final de fármaco deseada.

M5.2.- Vectores lentivirales para la expresión de silenciadores (shRNAs)

Los vectores lentivirales empleados en el desarrollo de este trabajo contienen secuencias reguladoras procedentes del virus HIV-I que lo capacitan para transducir células diana, integrar su genoma en el de la célula hospedadora y asegurar una expresión estable de la construcción génica de interés a largo plazo.

Estos vectores se generaron mediante transfección de células HEK293T siguiendo el procedimiento descrito anteriormente (sección M5). En este caso, las construcciones plasmídicas que se emplearon corresponden a un sistema de empaquetamiento lentiviral de tercera generación (Tabla M1). Brevemente, se co-transfectaron los plásmidos de empaquetamiento, pMDLg/pRRE (10 µg) y pRSV-Rev (3.6 µg); el plásmido de envuelta, pMD2.G (3 µg) y el vector de transferencia, pLKO.1, que expresa un silenciador tipo shRNA (10 µg).

En la Tabla M4, se indican las secuencias de los distintos shRNAs empleados para los ensayos de silenciamiento génico.

Para determinar los títulos de infectividad (unidades de transducción por ml) de cada stock de lentivirus generado, se sembraron células Huh-7 en un formato de placa multipocillo Mw12 (8×10^4 células por pocillo) y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Las células se inocularon con volúmenes crecientes de los diferentes stocks de lentivirus (30, 100 y 300 μ l por pocillo) y, al día siguiente, se incubaron en DMEMc suplementado con puromicina (5 μ g/ml) a 37°C durante 72 horas. Se incluyeron dos pocillos control de células Huh-7 sin transducir y tratadas o no tratadas con puromicina. En los experimentos de transducción que se describen en la sección M11 se empleó el volumen mínimo de stock de lentivirus suficiente para conferir resistencia a puromicina al 100% de las células del cultivo.

M6.- Medida de actividad luciferasa

Para medir los niveles de actividad luciferasa de las proteínas *Firefly*, *Renilla* o ambas simultáneamente se emplearon los kits Luciferase Assay System y Dual-Luciferase Assay System (*Promega*) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

M7.- Bacterias

M7.1.- Cepas y cultivo de bacterias

La cepa DH5 α de *E.coli* [genotipo *supE44* Δ *lacU169* (ϕ 80*lacZ* Δ M15) *hsdR17* *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi-1* *relA1*] se utilizó de rutina para la amplificación de todas las construcciones plasmídicas empleadas en el desarrollo de este trabajo.

El cultivo de bacterias se realizó en medio líquido Luria-Bertani (LB) o en placas de LB-agar a 30°C o 37°C dependiendo del plásmido. En función del gen de resistencia presente en cada plásmido, el medio de cultivo se suplementó con el antibiótico adecuado (100 μ g/ml de ampicilina, kanamicina o espectinomicina).

Tabla M4. Secuencia de los shRNAs empleados en ensayos de silenciamiento génico

shRNA ID	Especificidad	Secuencia (5'→3')	Referencia
shRNA-248	LPIN1	CCGGCGAGAGAAAGTGGTTGACATACTCGA GTATGTCAACCACTTTCTCGTTTTTG	Sigma-Aldrich TRCN0000153806
shRNA-1073	LPIN1	CCGGCCTCAGACAGAAATGCAGTTTCTCGA GAAACTGCA TTTCTGTCTGAGGTTTTTG	Sigma-Aldrich TRCN0000154092
shRNA-Ctrl	Thermotoga sp.	CCGGTAATTCTCCGAACGTGTCACGTTTCAA GAGAACGTGACACGTTCCGAGAATTTTTTG	(Friesland y col., 2013)
shRNA-359	IRES HCV	CCGGTACCTCAAAGAAAAACCAATTCAAGA GATTTGGTTTTCTTTGAGGTTTTTG	(Friesland y col., 2013)

M7.2.- Transformación de bacterias competentes mediante choque térmico y amplificación de cultivos bacterianos

Para la transformación de bacterias competentes DH5 α , se resuspendieron 50 ng/ μ l del DNA de interés en 25 μ l de bacterias y éstas se incubaron en hielo durante 30 min. Para someterla a un choque térmico, la suspensión de bacterias y DNA se calentó durante 30 segundos a 42°C e inmediatamente después se incubó en hielo durante 2-15 min. La mezcla se resuspendió en 500 μ l de medio LB (con o sin antibiótico, dependiendo de cada caso) y se incubó en un baño de agua a 37°C durante 1 hora. A continuación, se sembró 1/5 de la mezcla anterior en una placa de LB-agar con el antibiótico apropiado y se incubó a 37°C durante toda la noche .

Para la amplificación de cultivos bacterianos, se picaron colonias de las placas de LB-agar sembradas el día anterior y se llevaron a un volumen final de medio LB (suplementado con el antibiótico adecuado) que varió en función del procedimiento seguido para la purificación de DNA. Según cada caso, esta purificación se realizó a pequeña, mediana o gran escala empleando los reactivos *Pureyield Mini*, *Midi* o *Maxiprep System* (*Promega*), respectivamente, de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

M8.- Manipulación y análisis de DNA

M8.1.- Plásmidos

Los plásmidos utilizados en esta Tesis Doctoral son los que se enumeran en la Tabla

M1. Se amplificaron siguiendo la metodología descrita en la sección M7.2.

M8.2.- Electroforesis de DNA en geles de agarosa

La separación de fragmentos de DNA para estudios analíticos se realizó en geles de agarosa *Agarose D1 Medium EEO* (*Pronadisa, CONDA*) al 1-2% en TAE (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA, pH 8.3) con *SYBR Safe DNA gel stain* (*Life Technologies*).

M9.- Manipulación y análisis de RNA

M9.1.- Extracción y purificación de RNA

El RNA total fue extraído empleando el método de extracción isotiocianato de guanidinio que se describe en (Chomczynski y Sacchi 1987). Para ello, el extracto de células se resuspendió en 500 μ l de GTC (*Sigma*) y una mezcla de 1 μ l de glicógeno (*Roche*) en 50 μ l de acetato de sodio 2 M pH 4 para precipitar el RNA, 500 μ l de fenol saturado a pH 4.5 (*AMRESCO*) y 200 μ l de cloroformo. A continuación, la mezcla se agitó mediante inversión durante 15 segundos y se centrifugó a 12000 rpm y 4°C durante 10 min. La fase acuosa en la que se encuentra el RNA se trasvasó a un nuevo tubo y se resuspendió en 500 μ l de fenol (pH 4.5) y 200 μ l de cloroformo. La mezcla se agitó y centrifugó como antes y, una vez recuperada la fase acuosa, ésta se resuspendió en 500 μ l de cloroformo. Tras agitar y centrifugar la muestra, la fase acuosa se trasvasó a un nuevo tubo para resuspenderse en 600 μ l de isopropanol y almacenarse a -20°C durante, al

menos, 1 hora. A continuación, la muestra se centrifugó durante 25 min a 12000 rpm y 4°C. El sobrenadante se decantó y el precipitado resultante se lavó con etanol diluido en agua al 75%. Posteriormente, la muestra se volvió a centrifugar durante 10 min a 12000 rpm y 4°C; el sobrenadante se decantó y el precipitado final se lavó con etanol al 100%. Tras una última ronda de centrifugación (10 min, 12000 rpm, 4°C), el sobrenadante se decantó y el precipitado de RNA se dejó a TA para eliminar los restos de etanol mediante evaporación. El RNA purificado se resuspendió en agua tratada con dietilpírocarbonato (DEPC) y se cuantificó mediante espectrofotometría a 260 nm. Las muestras se conservaron a -80°C hasta su utilización.

M9.2.- Análisis de RNA mediante transcripción reversa y PCR cuantitativa (RT-qPCR)

La síntesis de cDNA o transcripción reversa (RT) se realizó utilizando el kit comercial TaqMan de Transcripción Reversa Multiscribe (*Applied Biosystems*).

En general, las reacciones de RT se realizaron utilizando como molde 500 ng de RNA total y empleando como iniciadores oligonucleótidos hexámicos al azar. La mezcla de reacción (10 µl), preparada según las indicaciones del fabricante, se incubó 10 min a 25°C, 30 min a 48°C y 5 min a 95°C en un termociclador GeneAmp PCR System 2700 (*Applied Biosystems*). Los 10 µl del producto de amplificación se resuspendieron 1:1 en agua DEPC. Una décima parte del cDNA generado se utilizó como molde para su posterior amplificación por PCR cuantitativa (qPCR), para lo que se emplearon

oligonucleótidos específicos (*Sigma Aldrich*; ver Tabla M5) diseñados con el programa Primer Express (*Life Technologies*) y el reactivo SYBR Green PCR Master Mix (*Life Technologies*). La mezcla de reacción se preparó con 1 µl de cada oligonucleótido (directo y reverso) a 5 µM, 7 µl de Power SYBR Green PCR Master Mix y 9 µl de agua DEPC, completando hasta un volumen final de reacción de 20 µl con 2 µl del cDNA correspondiente.

En todos los casos, la qPCR se realizó en un equipo ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (*Life Technologies*) y utilizando los parámetros: 2 min a 50°C, 10 min a 95°C, 40 ciclos de 15 seg a 95°C y 1 min a 60°C. Al final de la reacción de PCR, se añadió un paso de rampa de desnaturalización desde 60°C [temperatura de fusión (T_m) de los oligonucleótidos] hasta 95°C, con el fin de analizar la curva de disociación del producto amplificado. El límite de ciclos (C_t) fue determinado con el programa analítico 7000 System SDS Software (*Applied Biosystem*).

Para asegurar que la amplificación tuviera lugar en un rango lineal así como determinar la eficiencia de la reacción se incluyeron curvas patrón para cada uno de los genes/segmentos genómicos analizados. Estas curvas patrón permitieron transformar el dato directo de la PCR cuantitativa en un valor absoluto de cantidad mediante regresión lineal. Se prepararon a partir de diluciones seriadas (1:10), en agua libre de nucleasas, de un DNA plasmídico que contiene la secuencia del amplicón correspondiente.

Se utilizó el mRNA del gen GAPDH como control endógeno de la reacción de transcripción reversa. Calculando la distancia entre el número de copias de GAPDH determinado por qPCR de cada muestra con

Tabla M5. Oligonucleótidos empleados para la cuantificación de RNAs virales y celulares mediante RT-qPCR

Oligo	Secuencia (5' → 3')	Longitud (nt)	%GC	Amplificón	T _m (°C)
HCV up	TCTGCGGAACCGGTGAGTA	19	57.8	IRES HCV	66.9
HCV low	TCAGGCAGTACCACAAGG	18	55.5		59.9
GAPDH up	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC	19	57.8	GAPDH	61.3
GAPDH low	GAAGATGGTGATGGGATTTC	20	45		60.8
LPIN1 up	GAAGTTATCCCTATGCACCTGGC	23	52.1	LPIN1	66.5
LPIN1 low	GCTGGGAGCGATCACTTGG	19	63.1		68.3

respecto al promedio de copias de GAPDH de cada experimento obtuvimos un factor de corrección a aplicar a cada muestra. A continuación, calculamos el cociente *número de copias de RNA de nuestro gen problema/ factor de corrección asociado a cada muestra* y obtuvimos el número de copias relativas de RNA amplificadas en cada una de las situaciones objeto de estudio.

M10.- Inmunodetección de proteínas mediante Western Blot

La electroforesis de proteínas se llevó a cabo en geles de poliacrilamida y condiciones desnaturizantes según lo descrito previamente (Laemmli 1970).

Las muestras se resuspendieron en tampón de ruptura 1x (250 mM Tris-HCl pH 6.8, 500 mM DTT, 10% SDS, 0.5% azul de bromofenol, 50% glicerol), se desnaturizaron durante 10 min a 100°C, se centrifugaron a 12000 rpm y 4°C durante 10 min y se resolvieron mediante geles SDS-PAGE de porcentaje variable en función de los requerimientos de cada experimento (4% para apoB, 8% para LPIN1, NS3 y β -actina y 10% para alfa1-anti-tripsina) a una intensidad de corriente de 40 mA y un voltaje máximo de

150 V. Posteriormente, se transfirieron a filtros de fluoruro de polivinilideno (PVDF; *Immobilon P Millipore*) durante toda la noche, a 200 mA y 4°C en tampón de transferencia [10% buffer 10x (Tris 58 g/l, glicina 29 g/l, SDS 3.3 g/l), 70% agua, 20% metanol] y utilizando el sistema de electrotransferencia semi-líquido de *Biorad*.

El procesamiento de los filtros varió en función de la proteína a detectar. En el caso de la proteína LPIN1, tanto la solución de bloqueo como la dilución correspondiente de los anticuerpos primario y secundario se preparó con leche desnatada en polvo al 5% en TBS-0.1%Tween. El filtro se incubó con la solución de bloqueo durante 1 hora, a TA y en agitación. A continuación, ésta se reemplazó por la dilución correspondiente de anticuerpo primario (Tabla M2) y el filtro se incubó durante 4 horas en las mismas condiciones. Se realizaron tres lavados de 5 min cada uno en TBS-0.1%Tween, a TA y en agitación. Aplicando las mismas condiciones que para la solución de bloqueo, el filtro se incubó con la dilución correspondiente de anticuerpo secundario (Tabla M2) y, posteriormente, se lavó tres veces (5 min para cada lavado) con TBS-0.1%Tween, a TA y en agitación.

Para el resto de proteínas analizadas, los filtros se incubaron con una solución de

bloqueo al 3% de BSA en PBS-0.25%Tween durante 1 hora, a TA y en agitación. En las mismas condiciones de incubación, los filtros se trataron con la dilución correspondiente de anticuerpo primario (Tabla M2). Posteriormente, se realizaron tres lavados de 20 min cada uno con una solución de PBS-0.25%Tween, a TA y en agitación. La incubación con la solución de anticuerpo secundario (Tabla M2) se realizó durante 1 hora, a TA y en agitación. Posteriormente, se efectuaron otros tres lavados de 20 min cada uno con PBS-0.25% Tween.

Finalmente, se procedió al revelado de los filtros mediante reacciones de quimioluminiscencia incubándolos durante 1 min, en oscuridad, con una solución de revelado (100 mM Tris pH 8,5, 250 mM luminol, 90 mM ácido cumárico y 1 μ l de H_2O_2). Se expusieron películas fotográficas sensibles a quimioluminiscencia durante períodos variables de entre 2 segundos y 10 min. Para el revelado final de las películas se empleó la máquina reveladora M35 X-OMAT Processor (Kodak).

Las señales no saturadas de las distintas muestras se analizaron con el software Image J 1.44o según se describe en (Schneider, Rasband, y Eliceiri 2012) con objeto de determinar los valores de densidad relativos asociados a cada una de ellas y proceder a su cuantificación a partir de películas escaneadas.

M11.- Estudios de silenciamiento génico. Generación de líneas celulares deficientes en la expresión de la proteína celular LPIN1 mediante transducción lentiviral

Con objeto de silenciar de manera estable la proteína LPIN1 en células Huh-7 se procedió a su transducción con las construcciones lentivirales que expresan los silenciadores shRNA-248, shRNA-1073 y shRNA-Ctrl (Tabla M4) y que se generaron según se describe en la sección M5.2. Para ello, se sembraron células Huh-7 en un formato de placa multipocillo Mw6 (2×10^5 células por pocillo) y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Las células se inocularon con la dilución correspondiente de cada stock de lentivirus, determinada según se describe en la sección M5.2, y se incubaron a 37°C durante 24 horas. La solución de cultivo se reemplazó por medio fresco suplementado con puomicina (5 μ g/ml) y las células se volvieron a incubar a 37°C durante 48 horas hasta alcanzar una confluencia del 95-100% en todos los casos. Tras lavar las células con PBS atemperado, se levantaron con una solución al 0.5% de tripsina/EDTA y se dividieron en un número de placas variable en función de cada experimento. El silenciamiento de LPIN1 se verificó mediante Western Blot (sección M10) a distintos tiempos post-transducción. La utilización de estas células para los diferentes ensayos se llevó a cabo 7 días después de la transducción lentiviral, momento en el que se observa, de manera consistente, el silenciamiento máximo de LPIN1.

M12.- Estudio de la proliferación y viabilidad celular

M12.1.- Estudio de proliferación celular (biomasa) mediante tinción con cristal violeta

Para estudiar la capacidad de proliferación de un cultivo celular se empleó el método colorimétrico basado en tinción con cristal violeta que se describe en (Bernhardt y col., 1992). Para ello, se sembraron células Huh-7 en un formato de placa multipocillo Mw96 (1x10⁴ células por pocillo), en triplicado para cada muestra, y se incubaron a 37°C durante 24, 48, 72 y 96 horas. Se sembró una placa de células por punto de análisis del experimento. A 6 horas post-siembra, y sólo en los pocillos de células control, la solución de cultivo se reemplazó por 200 µl del tratamiento correspondiente [15 µM de Fluoxetina (control positivo de toxicidad), DMSO (vehículo) como control negativo ó 0.1% SDS, como control de fondo]. A los tiempos anteriormente indicados y en todos los pocillos, las células se fijaron con 200 µl de una solución de formaldehído al 4% en PBS durante 20 min y a TA. A continuación, las células se lavaron con agua y se tiñeron con 150-200 µl de una solución de cristal violeta (0.1% cristal violeta, 20% metanol en agua) durante 20-30 min a TA. El exceso de colorante se eliminó lavando con agua. El precipitado de cristal violeta se diluyó en 100 µl de una solución de solubilización al 1% de SDS en agua. La placa se agitó durante 20 min a TA hasta obtener una solución homogénea cuya absorbancia se midió a 595 nm.

Los valores relativos de biomasa se expresaron como porcentaje respecto de los valores obtenidos para el tratamiento control.

M12.2.- Análisis de la viabilidad celular mediante ensayo de MTT

Para evaluar la actividad metabólica de un cultivo celular se empleó el método colorimétrico basado en MTT [Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5difeniltetrazolio] que se describe en (Vistica y col., 1991). Este ensayo se realizó en paralelo al procedimiento descrito en la sección M12.1 por lo que los criterios seguidos para la siembra de células y su tratamiento con diferentes controles a 6 horas post-siembra fueron los mismos en ambos casos. A los tiempos de incubación anteriormente indicados (24, 48, 72 y 96 horas post-siembra) y en todos los pocillos, las células se incubaron con 50 µl de una solución en DMEMc que contenía 50 µg/ml de MTT, a 37°C y 5% CO₂ hasta observarse la formación de un precipitado violáceo (MTT formazán) que es producto de la reacción mediada por el sustrato MTT. A continuación, se retiró la solución con MTT y el precipitado se diluyó en 100 µl de una solución de solubilización (0.04 M HCl, 0.1% Nonidet P-40 diluidos en isopropanol). La placa se agitó hasta obtener una mezcla homogénea cuya absorbancia se midió a 595nm .

Los valores de absorbancia relativos se expresaron como porcentaje respecto de los valores mostrados por el tratamiento control.

La actividad mitocondrial por célula de los diferentes cultivos se calculó como el cociente entre los valores de absorbancia obtenidos en el ensayo de MTT y los valores de absorbancia correspondientes al ensayo de biomasa descrito en la sección M12.1.

M13.- Rastreo de una colección de compuestos químicos

El análisis de la librería NCC-201 (Evotec) para la identificación de compuestos químicos que fueran capaces de inhibir la infección por HCV se realizó siguiendo la metodología descrita en (Mingorance y col., 2014).

M13.1.- Identificación de compuestos con actividad antiviral mediante un ensayo de ELISA

Para identificar compuestos químicos con actividad antiviral a baja concentración, éstos se testaron a una concentración final de 10 μM según se describe en (Gastaminza, Whitten-Bauer, y Chisari 2010). Se sembraron células Huh-7.5.1 clon-2 en formato de placa multipocillo Mw96 (1×10^4 células por pocillo), en duplicados para cada compuesto, y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Se prepararon stocks de cada compuesto a una concentración final de 2x y se mezclaron 1:1 con el inóculo viral (cepa D183v) en DMEMc para obtener una MDI de 0.01. Las células se inoculaban con 100 μl de esta mezcla, se incubaron a 37°C durante 72 horas y se fijaron con formaldehído al 4% en PBS durante 20 min y a TA. A continuación, las células se lavaron dos veces con 200 μl de PBS y se incubaron con 50 μl de buffer de bloqueo (3% BSA, 0.3% Tritón X-100, 10% SBF y 5% de H_2O_2 diluidos en PBS) durante 1 hora a TA. Tras dos lavados con 200 μl de PBS, las células se incubaron con 50 μl de una dilución a 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de un anticuerpo recombinante de humano anti-E2 (cedido por Mansun Law; TSRI) (Tabla M2) en buffer de incubación (3% de BSA, 0.3%

de Tritón X-100 diluidos en PBS) durante 1 hora y a TA. Se realizaron cuatro lavados con 200 μl de PBS; las células se incubaron con la dilución óptima del correspondiente anticuerpo secundario (Tabla M2) durante 1 hora a TA y se volvieron a lavar, otras cuatro veces, con 200 μl de PBS. Finalmente, se evaluó la actividad peroxidasa residual debida a la presencia del antígeno viral E2 usando el kit comercial TMB de *Pierce*. La reacción se detuvo añadiendo 50 μl de 1N H_2SO_4 a cada uno de los pocillos y se midió la absorbancia a 450 nm (OD_{450}).

Los valores relativos de infección se determinaron a partir de las curvas estándar que se prepararon con diluciones seriadas (1:2) del inóculo viral en DMEMc y que se incluyeron en cada placa.

Los valores colorimétricos se transformaron en valores de eficiencia de infección utilizando las curvas estándar y tras restar los valores de fondo correspondientes a los pocillos control. Sólo se consideraron como válidos los datos para curvas estándar con coeficientes de correlación (r^2) superiores a 0,97.

M13.2.- Discriminación entre compuestos tóxicos y antivirales: identificación de falsos-positivos

Una vez realizado el ensayo de ELISA anterior y con objeto de evaluar la biomasa celular tal y como se describe en la sección M12.2, las células se lavaron con agua antes de teñirse con 150-200 μl de una solución de cristal violeta.

Los valores relativos de biomasa se expresaron como porcentaje respecto de los valores obtenidos para los pocillos control de

la curva estándar.

M13.3.- Compuestos químicos

La librería NCC-201 del NIH (*Evotec*) elegida para nuestro estudio incluye 281 compuestos que se encontraban reconstituídos en DMSO a una concentración final de 10 mM.

Los compuestos químicos empleados en este trabajo son los siguientes:

Compuesto	Proveedor	Referencia
Hidroxicina pamoato	Sigma Aldrich	H9010
Fluoxetina	Sigma Aldrich	F132
Perfenacina	Sigma Aldrich	P6402
Benzotropina mesilato	Selleckchem	S3163
2'-C- metiladenosina	BOC Sciences	15397-12-3

Todos los compuestos se reconstituyeron en DMSO a una concentración final de 10 mM y se almacenaron en pequeñas porciones a -20°C.

M13.4.- Determinación de los índices de potencia (EC_{50}) y toxicidad (CC_{50})

Para el análisis de ambos parámetros se sembraron, en duplicado, células Huh-7.5.1 clon-2 en formato de placa multipocillo Mw96 (1×10^4 células por pocillo). Se prepararon diluciones seriadas (1:3) de cada uno de los compuestos en DMEMc (concentración final de compuesto en contacto con las células desde 50 μ M a 2.5 nM). En el caso de la CC_{50} , las células se incubaron con 200 μ l de cada dilución de compuesto a 37°C y durante 72 horas. En el caso de la EC_{50} , el inóculo viral

(cepa D183v) se mezcló 1:1 con las diluciones anteriores de compuesto hasta obtener una MDI de 0.01. Las células se inocularon con 100 μ l de la mezcla virus-compuesto, se incubaron a 37°C durante 72 horas y se fijaron con 200 μ l de formaldehído al 4% en PBS durante 20 min y a TA.

Para determinar la EC_{50} de los diferentes compuestos (o EC_{90} cuando fue necesario), se midió la eficiencia relativa de infección mediante el ensayo colorimétrico de ELISA descrito en la sección M13.1.

La determinación de la CC_{50} se realizó mediante el ensayo colorimétrico basado en MTT que se describe en la sección M12.2. En este caso, las células se sembraron en duplicado para cada uno de los compuestos a testar. A 72 horas post-siembra, la solución de cultivo se reemplazó por 50 μ l de DMEMc en el caso de los pocillos problema o por 50 μ l de DMEMc suplementado con DMSO (10 μ M) (vehículo), 0.1% SDS o azida sódica (200 mM a 50 mM) (fondo del ensayo) en el caso de los pocillos control. A continuación, las células se incubaron a 37°C durante 30 min; se trataron con 50 μ l de una solución en DMEMc que contenía 50 μ g/ml de MTT y se incubaron a 37°C y 5% CO_2 para ser procesadas según se describe en la sección M12.2.

M13.5.- Ensayos de “tiempo de adición”

Con objeto de discriminar entre eventos de unión de la partícula viral a la célula diana o eventos posteriores a dicha unión, se realizaron ensayos de “tiempo de adición” a baja temperatura. Para ello, se sembraron células Huh-7 en formato de placa multipocillo Mw96 (1×10^4 células por pocillo), en triplicado para cada muestra, y se incubaron a 37°C

durante 24 horas. Se prepararon soluciones madre, en DMEMc, de cada uno de los compuestos de interés a una concentración final que era dos veces la indicada en la sección R1.2 así como diluciones seriadas (1:5) de un stock de D183v. Para estudiar el impacto de los compuestos sobre la adsorción del virus a la célula, las células se inocularon con 200 μ l de una mezcla 1:1 de las preparaciones anteriores de virus y compuesto y se incubaron a 4°C durante 1 hora para promover la adsorción sin internalización (Tscherne y col., 2006). Para evaluar el papel de los mismos sobre eventos posteriores a la adsorción viral, las células se incubaron con 200 μ l de la dilución correspondiente de virus en ausencia de compuesto, a 4°C, durante 1 hora. En ambos casos, las células se lavaron una vez con PBS frío. A continuación, las células se incubaron en DMEMc durante 72 horas para estudiar los eventos relativos al proceso de adsorción o con medio de cultivo suplementado con cada uno de los compuestos de interés a la concentración indicada para estudiar los eventos post-adsorción. A 72 hpi, la eficiencia relativa de infección se evaluó mediante inmunomicroscopía y recuento del número de focos de infección (sección M2.2.4) para determinar si los compuestos de interés inhiben los procesos de adsorción y/o post-adsorción.

M14.- Análisis estadístico

Los valores representados en las gráficas corresponden a la media de los datos \pm el valor de la desviación estándar ($n > 3$) o error promedio ($n < 3$) de las muestras según correspondiese en cada caso. Los grupos de

datos fueron sometidos al test de la t de Student como verificación de la significación estadística empleando la hoja de cálculo Excel (*Microsoft Office*).

Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando el p-valor calculado fue menor de 0.05, 0.01 o 0.005 y se indicaron mediante asteriscos (*, ** o ***, respectivamente) en las gráficas.

8. RESULTADOS

R1.- Identificación de compuestos inhibidores de la infección por el virus de la hepatitis C

La enorme diversidad genética que exhiben los virus de la hepatitis C, la aparición de mutantes resistentes, el grado de enfermedad hepática que presenta cada paciente y el elevado coste de las terapias actualmente disponibles para el tratamiento de la infección crónica por HCV son obstáculos para la efectividad e implementación de las mismas entre la mayoría de la población infectada.

Existe la necesidad, por tanto, de identificar y/o desarrollar nuevos fármacos que, en combinación con las terapias ya existentes, muestren actividad pangenotípica, contengan la expansión de mutantes resistentes, ayuden a revertir la patogénesis asociada a la infección y sean asequibles para los individuos infectados.

R1.1.- Rastreo de una quimioteca de fármacos de uso clínico para la identificación de nuevos inhibidores de la infección por el virus de la hepatitis C

Con objeto de identificar inhibidores específicos de la infección por el virus de la hepatitis C analizamos una librería de 281 compuestos químicos (NCC-201, NIH) (sección M13) que han sido aprobados para su uso clínico, no para el tratamiento de la infección por HCV, aplicando el sistema de rastreo no sesgado que se describe en (Gastaminza y col., 2011; Gastaminza, Whitten-Bauer, y Chisari 2010) (ver sección M13.1). Este sistema permite identificar compuestos antivirales no tóxicos que afectan a cualquier paso de la infección viral independientemente de si la

diana molecular es viral o celular (Gastaminza y col., 2011; Gastaminza, Whitten-Bauer, y Chisari 2010). Todos los compuestos se ensayaron a una concentración final de 10 μ M; para ello, se prepararon soluciones madre de cada compuesto a una concentración de 20 μ M. A continuación, se inocularon células Huh-7.5.1 clon-2 (sección M1) con una mezcla 1:1 del virus D183v (genotipo 2a, MDI de 0.01) y la solución madre de cada compuesto a 20 μ M (sección M13.1). La eficiencia relativa de infección así como los valores de citotoxicidad asociados al tratamiento con los diferentes compuestos se determinaron a 72 hpi, siguiendo la metodología descrita en las secciones M13.1 y M13.2, respectivamente. Se seleccionaron como positivos todos aquellos compuestos que muestran una reducción en la eficiencia de infección de más de 20 veces con respecto al tratamiento control DMSO (vehículo) descartando los que interfieren con la proliferación celular (acumulación de biomasa inferior al 85%; ver sección M13.2). Los compuestos que, según este criterio, resultaron tóxicos a pesar de presentar un efecto antiviral próximo al 100% fueron ensayados, nuevamente, a una concentración final de 2 μ M con objeto de identificar compuestos de mayor potencia que podrían ser descartados por su aparente toxicidad.

Para validar los resultados del primer rastreo se realizó un segundo análisis, aplicando la misma metodología que anteriormente, sobre los compuestos ya seleccionados confirmándose las primeras observaciones. Tras este proceso de selección, identificamos 11 compuestos capaces de inhibir la infección por el virus de la hepatitis C en más de un orden de magnitud con respecto al control (DMSO) sin disminuir de manera

significativa la acumulación de biomasa celular (ver Tabla R1).

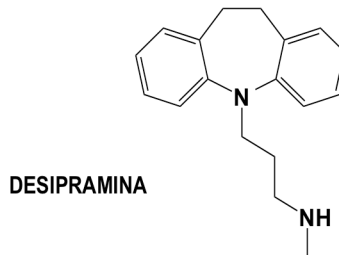
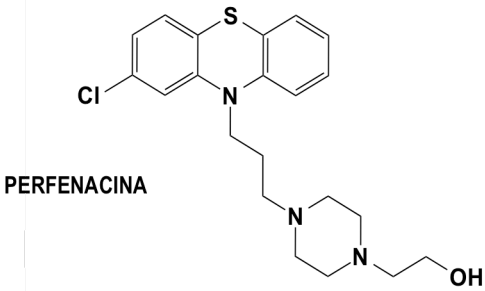
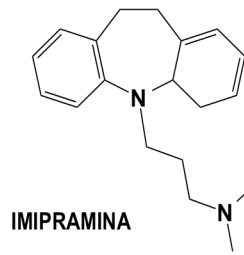
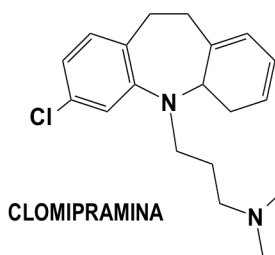
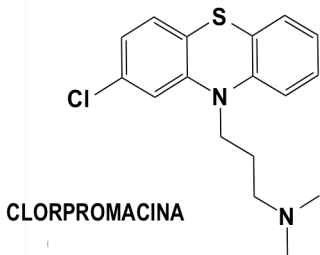
En la Figura R1 se muestra la estructura química de los 11 compuestos seleccionados. De estos 11 compuestos, 5 son antidepresivos tricíclicos (Figura R1, grupo 1), muy similares a los que ya se identificaron como inhibidores de la infección por HCV en (Gastaminza, Whitten-Bauer, y Chisari 2010) y que otros grupos también han caracterizado

posteriormente (Chamoun-Emanuelli y col., 2013; Hu y col., 2014). El segundo grupo engloba 3 compuestos (Figura R1, grupo 2) que funcionan como moduladores sintéticos del receptor de estrógenos (SERMs) y que actúan inhibiendo diferentes aspectos del ciclo replicativo de HCV (Murakami y col., 2013); asimismo, estos compuestos son muy parecidos estructuralmente al citrato de toremifeno, otro SERM que fue identificado

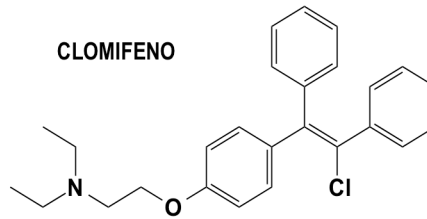
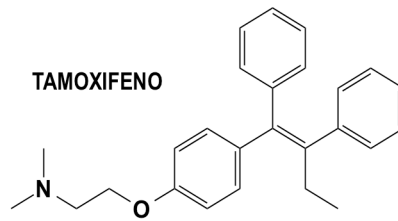
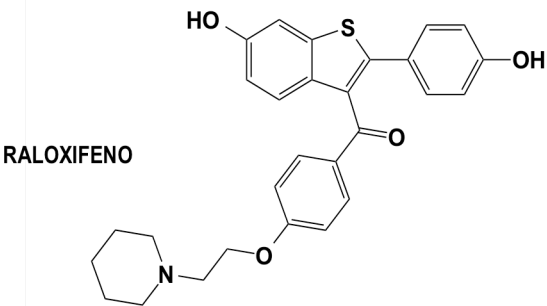
Grupo	NCC_ID Estructura	Concentración (μ M)	Nombre	Eficiencia de infección (%)	Biomasa (%)
1: Antidepresivos tricíclicos	CPD000058254	10 μ M	Clorpromacina	0.14 \pm 0.20	90.19 \pm 3.54
	CPD000058295	10 μ M	Clomipramina	0.22 \pm 0.10	93.48 \pm 0.76
	CPD000036827	10 μ M	Desipramina	0.22 \pm 0.17	88.56 \pm 5.99
	CPD000058180	10 μ M	Perfenacina	0.60 \pm 0.52	88.22 \pm 10.84
	CPD000058388	10 μ M	Imipramina	2.25 \pm 1.87	106.96 \pm 4.58
2: SERMs	CPD000058508	10 μ M	Raloxifeno	0.09 \pm 0.12	91.82 \pm 20.05
	CPD001491671	10 μ M	Tamoxifeno	1.09 \pm 1.53	96.05 \pm 4.91
	CPD001317855	10 μ M	Clomifeno	5.04 \pm 0.87	149.75 \pm 2.62
3: Otros	CPD001370751	10 μ M	Hidroxicina	4.59 \pm 6.48	87.51 \pm 6.8
	CPD000394012	10 μ M	Benzotropina	0.51 \pm 0.50	93.87 \pm 3.11
	CPD000058452	10 μ M	Fluoxetina	15.41 \pm 2.47	159.34 \pm 2.00

Tabla R1. Candidatos seleccionados durante el rastreo de la quimioteca. Se inocularon células Huh-7.5.1 clon-2 con una mezcla 1:1 en DMEMc que contenía el compuesto de interés a una concentración final de 2x y el inóculo viral diluido hasta obtener una MDI de 0.01. A 72 hpi, se determinaron los valores de eficiencia relativa de infección mediante el ensayo colorimétrico que se describe en la sección M13.1 empleando una curva estándar con diluciones seriadas (1:2) del inóculo viral. Los valores relativos de biomasa se determinaron, a posteriori, en los mismos pocillos mediante un ensayo colorimétrico basado en tinción con cristal violeta (sección M13.2). Todos los valores se expresan como porcentaje relativo respecto de los pocillos control (100%). Los datos se muestran como valor promedio y desviación estándar de dos experimentos independientes ($n=2$). NCC_ID, Identificador en Pubmed de la estructura de un compuesto químico.

Grupo 1: Antidepresivos tricíclicos



Grupo 2: Moduladores del receptor de estrógenos (SERMs)



Grupo 3: Otros

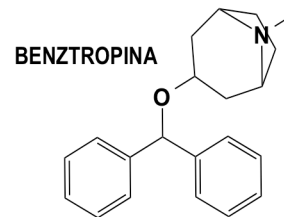
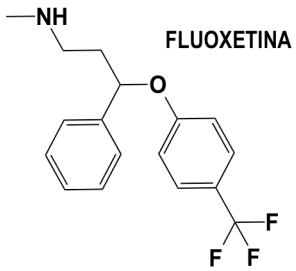
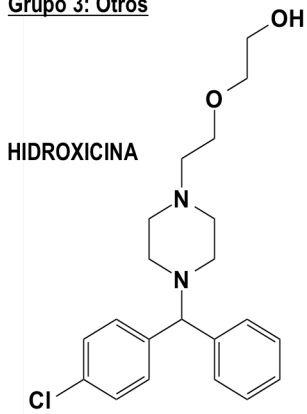


Figura R1. Estructura química de los compuestos seleccionados

aplicando este mismo sistema de rastreo en (Gastaminza, Whitten-Bauer, y Chisari 2010). Finalmente, en el tercer grupo se incluyen 3 compuestos que no se consideran en las categorías anteriores: hidroxicina pamoato, en adelante referida como hidroxicina, es un antagonista del receptor H1 de histamina efectivo en el tratamiento de desórdenes dermatológicos crónicos y de la ansiedad; fluoxetina, un inhibidor altamente específico de la captura de serotonina empleado como anti-depresivo y benztropina mesilato, en adelante referida como benztropina, que es un antagonista de los receptores muscarínicos que se emplea en el tratamiento sintomático de la enfermedad de Parkinson (Figura R1, grupo 3).

Dada la semejanza estructural que presentan los compuestos del primer y segundo grupo con otros compuestos que ya se han descrito como inhibidores específicos de la infección por HCV (Gastaminza, Whitten-Bauer, y Chisari 2010; Murakami y col., 2013), decidimos centrar nuestra atención en los compuestos del tercer grupo. No obstante,

incluimos perfenacina (Figura R1, grupo 1) en todos nuestros ensayos como control de inhibición de HCV (Hu y col., 2014).

R1.2.- Cálculo de la concentración efectiva y del índice terapéutico de los compuestos seleccionados

Dado que los compuestos identificados como antivirales son fármacos de uso clínico, se quiso determinar si su concentración efectiva es comparable a la que se puede alcanzar en pacientes así como la ventana terapéutica que existe en cultivo celular para cada uno de ellos. Para ello, se calcularon los índices de potencia (EC_{50}) y toxicidad (CC_{50}) y el cociente CC_{50}/IC_{50} o índice terapéutico (I.T.) (sección M13.4).

Para determinar estos valores se adquirieron los compuestos seleccionados de proveedores diferentes a los de la quimioteca original (sección M13.3). Como se indica en la Tabla R2, todos los compuestos seleccionados presentan una EC_{50} inferior a 1 μM y una CC_{50}

Nombre Compuesto	EC_{50} (μM)	EC_{90} (μM)	CC_{50} (μM)	I.T.
Hidroxicina	0.26 ± 0.13	0.55 ± 0.25	46.25 ± 6.25	178
Benzotropina	0.67 ± 0.29	2.75 ± 1.08	26.25 ± 1.76	39
Fluoxetina	0.45 ± 0.27	1.50 ± 1.05	10.25 ± 1.76	23
Perfenacina	1.00 ± 0.45	4.50 ± 1.44	10.50 ± 0.70	10

Tabla R2. Potencia y toxicidad de los compuestos seleccionados. Siguiendo la metodología descrita en la sección M13.4 se determinaron los índices de potencia (EC_{50} and EC_{90}) y citotoxicidad (CC_{50}) para los compuestos seleccionados. Los índices de potencia se muestran como promedio y desviación estándar de un mínimo de cuatro experimentos independientes ($n=4$). El índice de citotoxicidad se calculó en paralelo a la determinación del índice EC_{50} en cultivos celulares sin infectar y se muestra como valor promedio y desviación estándar de tres experimentos independientes ($n=3$). Los índices terapéuticos (I.T.) se calcularon mediante determinación del ratio de los valores promedio obtenidos para CC_{50} y EC_{50} .

que es significativamente mayor asegurando I.T.s superiores a 10. De los cuatro compuestos analizados, hidroxicina presenta la mayor potencia (EC_{50} de $0.26 \pm 0.13 \mu M$) y menor toxicidad (CC_{50} de $46.25 \pm 6.25 \mu M$) con un I.T. de 178. La ventana terapéutica más reducida se observa para perfenacina cuyo I.T. es de sólo 10, debido a que presenta una EC_{50} de $1 \pm 0.45 \mu M$ y una CC_{50} de $10.50 \pm 0.70 \mu M$. Para benztropina y perfenacina se detectaron valores intermedios de potencia, toxicidad y, por consiguiente, I.T. En el caso de benztropina, la EC_{50} es de $0.67 \pm 0.29 \mu M$, su CC_{50} de $26.25 \pm 1.76 \mu M$ y presenta un I.T. de 39; para fluoxetina, los valores de EC_{50} y CC_{50} fueron de 0.45 ± 0.27 y $10.25 \pm 1.76 \mu M$, respectivamente, con un I.T. de 23. Salvo que se indique lo contrario, todos los ensayos descritos a partir de aquí se realizaron empleando una concentración final de $3 \mu M$ para fluoxetina, $5 \mu M$ para perfenacina e hidroxicina y $7.5 \mu M$ para benztropina, que fueron establecidas al ser aproximadamente 2 veces la EC_{90} de los compuestos presentes en la quimioteca original.

Con objeto de confirmar la capacidad de estos compuestos para inhibir la propagación del virus de la hepatitis C en cultivo celular empleamos un sistema alternativo de monitorización de la progresión de la infección. Para ello, se inocularon células Huh-7.5.1 clon-2 con el virus parental JFH-1 (MDI de 0.01), en presencia de los diferentes compuestos o el control DMSO (vehículo) (sección M2.3.2). A día 6 post-infección, se recogieron extractos celulares para su análisis mediante Western Blot (sección M10) empleando un anticuerpo específico frente a la proteína viral NS3 (Figura R2A). Confirmamos que el tratamiento con perfenacina, hidroxicina y benztropina inhibe

en más de 10 veces la propagación del virus respecto del control (Figura R2B) lo que sugiere que todos ellos son inhibidores eficaces de la infección por HCV. A pesar de su aparente potencia, fluoxetina parece inhibir la propagación del virus de forma menos eficaz que el resto de los compuestos (Figura R2B). Dado que el I.T. de este compuesto es relativamente bajo y no permite aumentar mucho la dosis de compuesto en nuestros

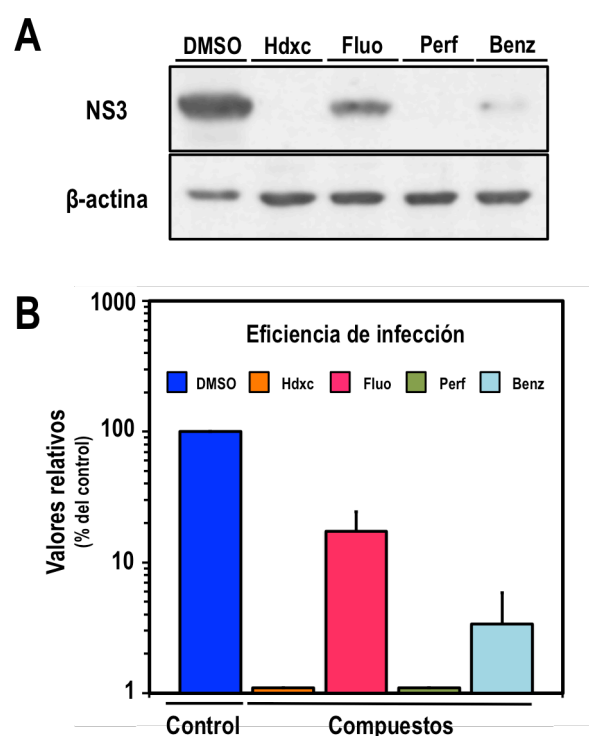


Figura R2. Los compuestos seleccionados inhiben la propagación de la cepa JFH-1. Se inocularon células Huh-7.5.1 clon-2 con el virus JFH-1 (MDI de 0.01) en presencia de hidroxicina ($5 \mu M$), perfenacina ($5 \mu M$), fluoxetina ($3 \mu M$), benztropina ($7.5 \mu M$) o el control DMSO. (A) A día 6 post-infección, se recogieron extractos celulares para determinar los niveles de expresión de NS3 y β -actina como control de carga mediante Western Blot. (B) Eficiencia de infección de la cepa JFH-1 determinada en base a la señal de NS3 normalizada por β -actina y expresada como valor promedio y error promedio de la n correspondiente ($n=2$). Todos los valores se expresan como porcentaje del control (100%). Hdcx, hidroxicina; Perf, perfenacina; Fluo, fluoxetina; Benz, benztropina.

ensayos, se descartó el empleo de fluoxetina para experimentos posteriores.

En conjunto, estos resultados sugieren que hidroxicina y benztropina son buenos candidatos antivirales con uso potencial en el tratamiento de la infección por el virus de la hepatitis C.

R.1.3.- Los compuestos seleccionados inhiben aspectos tempranos de la infección por HCV

Una vez que confirmamos y evaluamos la actividad antiviral de los compuestos seleccionados, nuestro siguiente objetivo fue identificar qué aspectos del ciclo replicativo del virus de la hepatitis C se encuentran inhibidos por los mismos. Para ello, se llevaron a cabo ensayos de infección de ciclo único. Brevemente, se inocularon células Huh-7 con el virus D183v a una MDI de 10 en presencia de los diferentes compuestos (sección M2.3.1) y, a 48 hpi, se recogieron muestras de sobrenadantes y de células infectadas. Los sobrenadantes se titularon mediante dilución límite, inmunofluorescencia y recuento de focos de infección (sección M2.2.4) para determinar los títulos de infectividad extracelular que, como se indica en la Figura R3A, muestran una reducción de 1 orden de magnitud con respecto al control (DMSO) en el caso de benztropina y de 2 órdenes de magnitud en el caso de hidroxicina y perfenacina.

Los extractos de células infectadas se emplearon para determinar los niveles de RNA viral intracelular mediante RT-PCR cuantitativa (sección M9.2) observándose una reducción de más de 2 órdenes de magnitud con respecto al control en el caso

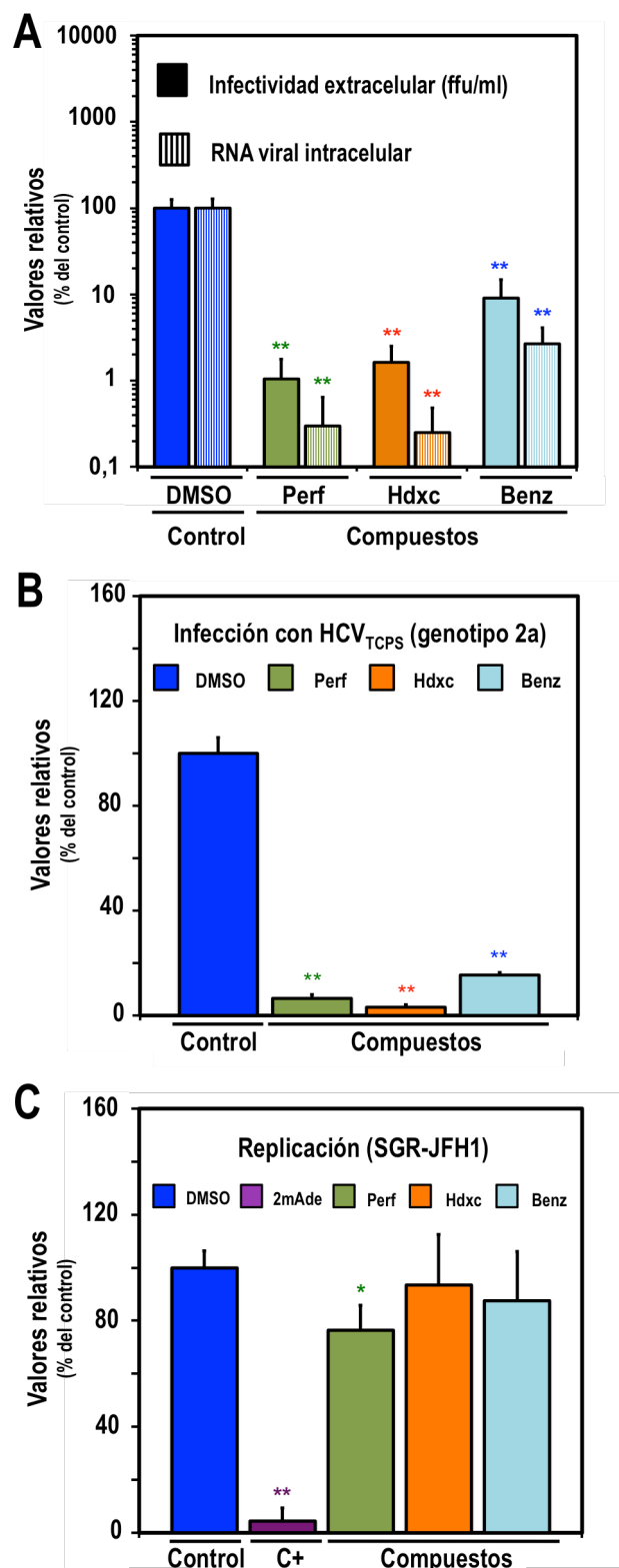


Figura R3. Los compuestos seleccionados inhiben aspectos tempranos de la infección por el virus de la hepatitis C. (A) Se inocularon células Huh-7 con el virus D183v (MDI de 10) en presencia de perfenacina (5 μ M), hidroxicina (5 μ M), benztropina (7.5 μ M) o el control DMSO.

A 48 hpi, se recogieron sobrenadantes y extractos celulares para determinar la producción de progenie infecciosa mediante determinación de los títulos de infectividad extracelular (ffu/ml) y los niveles de RNA viral intracelular mediante RT-PCR cuantitativa, respectivamente. Los datos provienen de dos experimentos independientes realizados en triplicado ($n=6$). (B) Inhibición de la infección con HCV_{TCPs}. Se inocularon células Huh-7 con HCV_{TCPs} en presencia de perfenacina (5 μ M), hidroxicina (5 μ M), benzotropina (7.5 μ M) o el control DMSO y, a 48 hpi, se determinaron los niveles de actividad luciferasa (sección M6). Los datos son representativos de dos experimentos independientes realizados en triplicado ($n=6$). (C) Inhibición de la replicación del SGR-JFH1. Se electroporaron células Huh-7 con el replicón SGR-JFH1-luc y, a continuación, se trataron con perfenacina (5 μ M), hidroxicina (5 μ M), benzotropina (7.5 μ M) o DMSO y 2mAde (10 μ M) como controles negativo y positivo, respectivamente. A 24 hpe, se determinaron los niveles de actividad luciferasa. Los datos son representativos de dos experimentos independientes realizados en duplicado ($n=4$). Todos los datos se muestran como valor promedio y desviación estándar de la n correspondiente y se expresan como porcentaje del control (100%). La significancia estadística de las diferencias con respecto al control se determinaron mediante la prueba t de Student's (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$). *Hdxc*, hidroxicina; *Perf*, perfenacina; *Benz*, benzotropina; *C+*, control positivo de inhibición.

de hidroxicina y perfenacina y de más de 30 veces en el caso de benzotropina (Figura R3A). Esta disminución en los niveles de RNA viral intracelular va en paralelo a la reducción observada en los títulos de infectividad extracelular (Figura R3A) lo que indica que estos inhibidores interfieren con algún aspecto temprano de la infección por el virus de la hepatitis C que conduce a la acumulación de RNA viral.

Se obtuvieron resultados similares mediante un sistema alternativo de infección basado en el empleo de HCV_{TCPs} (sección M4)

que son viriones defectivos de HCV portadores de un gen marcador (luciferasa) que producen una única ronda de infección. Siguiendo la metodología descrita en la sección M4, se inocularon células Huh-7 con un stock de HCV_{TCPs} en presencia de los compuestos seleccionados y, a 48 hpi, se determinaron los niveles intracelulares de luciferasa (sección M6). La eficiencia de infección de las HCV_{TCPs} se reduce en más de 10 veces con respecto al control en el caso de hidroxicina y perfenacina y en más de 5 veces en las células tratadas con benzotropina (Figura R3B). Estos resultados sugieren que los compuestos seleccionados inhiben un evento temprano de la infección por HCV (entrada del virión, traducción o replicación del genoma viral) y refuerzan la observación realizada durante los ensayos de infección de ciclo único (Figura R3A).

Con objeto de determinar si los compuestos anteriores tienen como diana aspectos tempranos de la replicación viral (traducción primaria o replicación del genoma independientemente de la entrada del virus), se electroporaron células Huh-7 con el replicón subgenómico SGR-JFH1-luc y se incubaron, durante 24 horas, con los compuestos de interés (sección M3). Los niveles intracelulares de luciferasa se determinaron a 24 hpe (sección M6). Células tratadas con el inhibidor de replicación 2mAde (10 μ M) presentan una reducción de 25 veces con respecto al control DMSO (Figura R3C) en los niveles de expresión de luciferasa lo que indica que, en este sistema, la acumulación de luciferasa depende de la replicación viral. Los niveles de actividad luciferasa detectados en las células tratadas con hidroxicina y benzotropina son comparables a los de la línea celular control (DMSO) (Figura R3C) observándose una reducción estadísticamente

significativa, aunque marginal en su magnitud, en el caso de perfenacina. Estos resultados indican que los eventos más tempranos de la replicación viral no se encuentran afectados por los compuestos seleccionados y sugieren que su diana podría ser un estadio temprano del ciclo infeccioso anterior a la traducción primaria, probablemente a nivel de entrada.

R1.4.- Análisis del impacto de los inhibidores seleccionados sobre la infección persistente por el virus de la hepatitis C

Con objeto de evaluar el impacto de estos inhibidores sobre aspectos tardíos de la infección por el virus de la hepatitis C empleamos un modelo de infección persistente. Para ello, inoculamos células Huh-7 a baja multiplicidad de infección (MDI de 0.01) con la cepa JFH-1 de HCV (sección M2.3.3). Una vez establecida la infección, las células se incubaron en presencia de cada uno de los compuestos, a las concentraciones antivirales ya indicadas (sección R1.2), o de los controles DMSO y 2mAde (10 μ M) y, a 48 horas post-tratamiento, se recogieron sobrenadantes y extractos de células infectadas (sección M2.3.3). Los sobrenadantes se titularon como se indica en la sección M2.2.4 para evaluar el impacto de estos inhibidores sobre la producción de progenie infecciosa. Los extractos de células infectadas se emplearon para determinar los niveles intracelulares de RNA viral mediante RT-PCR cuantitativa (sección M9.2).

El tratamiento con el inhibidor de replicación 2mAde (10 μ M), empleado como control positivo, provoca una reducción significativa de más de 2 órdenes de magnitud con respecto al control DMSO en los niveles

intracelulares de RNA viral así como en los títulos de infectividad extracelular (Figura R4) lo que indica que el abordaje experimental empleado permitiría la identificación de inhibidores de la replicación viral.

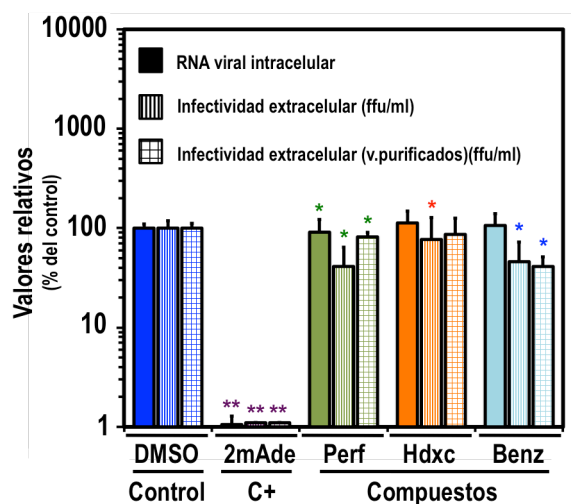


Figura R4. Impacto de los compuestos seleccionados en la infección persistente por el virus de la hepatitis C. Células Huh-7 persistentemente infectadas con la cepa JFH-1 (genotipo 2a) del virus de la hepatitis C se trataron con perfenacina (5 μ M), hidroxicina (5 μ M), benztropina (7.5 μ M) y DMSO y 2mAde (10 μ M) como controles negativo y positivo, respectivamente. A 48 h post-tratamiento, se recogieron sobrenadantes y extractos de células infectadas para determinar los títulos de infectividad extracelular mediante inmunomicroscopía de fluorescencia (sección M2.2.4) y niveles de RNA viral intracelular mediante RT-PCR cuantitativa, respectivamente. Para eliminar los restos de compuesto que pudieran estar presentes en los sobrenadantes, se purificaron los viriones infecciosos mediante microfiltración. A continuación, se determinaron los títulos de infectividad extracelular en los sobrenadantes purificados. Los datos se muestran como valor promedio y desviación estándar de los resultados obtenidos en dos experimentos independientes realizados en triplicado ($n=6$) y se expresan como porcentaje del control (100%). La significancia estadística de las diferencias con respecto al control se determinaron mediante la prueba t de Student's (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$). Hdxc, hidroxicina; Perf, perfenacina; Benz, benztropina; C+, control positivo de inhibición.

En las células tratadas con hidroxicina y benztropina, los niveles intracelulares de RNA viral son comparables a los de la línea celular control (DMSO) mientras que éstos disminuyen de manera estadísticamente significativa, aunque marginal, como consecuencia del tratamiento con perfenacina (Figura R4). En conjunto, estos resultados indican que los compuestos seleccionados no inhiben la replicación del RNA viral en el contexto de una infección persistente.

Los títulos de infectividad extracelular muestran una reducción significativa con respecto a la línea celular control (DMSO) como consecuencia del tratamiento con hidroxicina, benztropina y perfenacina (Figura R4). Es posible que la presencia de compuesto en los sobrenadantes durante su titulación interfiera en la determinación de los títulos de infectividad extracelular. Para evitar una infravaloración de los mismos, se purificaron los viriones infecciosos de los sobrenadantes de células infectadas por microfiltración y, a continuación, se titularon según se describe en la sección M2.2.4. Las células tratadas con hidroxicina muestran unos títulos de infectividad extracelular comparables a los de la línea celular control (DMSO) (Figura R4). El tratamiento con perfenacina y benztropina provoca una reducción significativa del 20% y 60%, respectivamente, en los títulos de infectividad extracelular.

En conjunto, estos resultados sugieren que ni la replicación del RNA viral ni la producción de progenie infecciosa se encuentran significativamente afectadas por el tratamiento con los compuestos seleccionados en el contexto de una infección persistente, con la excepción de una pequeña reducción en la producción de virus progenie en las células tratadas con benztropina. Estas

observaciones confirman los resultados obtenidos en los ensayos de infección de ciclo único (Figura R3A) y con HCV_{TCPs} (Figura R3B) que sugieren que un evento temprano del ciclo infeccioso del HCV, que precede a la replicación del RNA viral (Figura R3C), es susceptible de inhibición por estos compuestos.

R1.5.- Los compuestos seleccionados inhiben la entrada de varios genotipos del virus de la hepatitis C

Para determinar si los compuestos seleccionados inhiben la entrada del virus de la hepatitis C en la célula hospedadora, empleamos el modelo de entrada viral sustitutivo basado en pseudopartículas retrovirales (HCV_{pp}) que se describe en la sección M5.1. Se inocularon células Huh-7 con una mezcla 1:1 de compuesto y HCV_{pp} que presentan, en su envuelta, las glicoproteínas de genotipos distintos del virus de la hepatitis C (1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 4 y 5). Adicionalmente, y como controles de especificidad de inhibición, se emplearon partículas retrovirales pseudotipadas con la proteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV_{pp}), la glicoproteína del retrovirus felino (RD114) o las glicoproteínas de la envuelta HA y NA del virus de la gripe (FLU) (ver sección M5.1). A 72 hpi se midió la acumulación intracelular de luciferasa (sección M6). La actividad luciferasa es proporcional a la capacidad de las envueltas correspondientes de mediar en los diferentes eventos que permiten la entrada viral (reconocimiento de receptores, internalización de la partícula viral y fusión de membranas) por lo que este sistema de infección es una herramienta útil para la

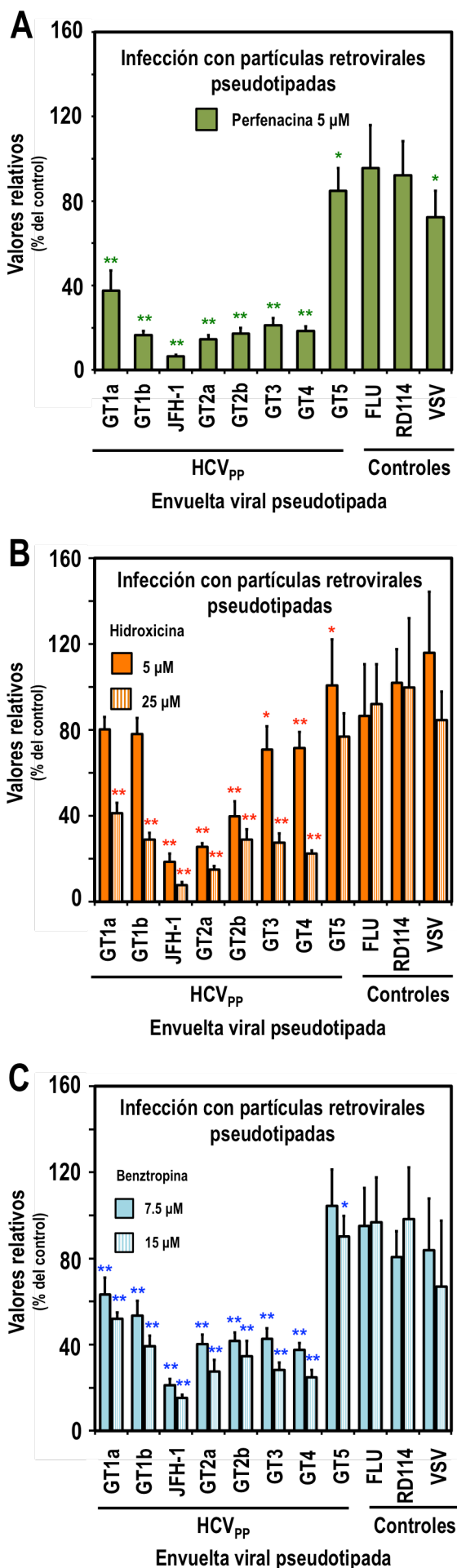


Figura R5. Hidroxicina, benztropina y perfenacina inhiben la entrada de HCV. Se infectaron células Huh-7 con partículas retrovirales pseudotipadas que expresan las glicoproteínas de la envuelta de distintos genotipos de HCV (HCV_{pp}) en presencia de perfenacina (5 μ M), hidroxicina (5 μ M y 25 μ M), benztropina (7.5 μ M y 15 μ M) o el control DMSO. Adicionalmente, se emplearon partículas pseudotipadas que expresan las glicoproteínas de la envuelta de VSV, el virus de la gripe (FLU) o el retrovirus felino (RD114) para determinar la especificidad de la inhibición. Los datos se muestran como valor promedio y desviación estándar de los resultados de dos experimentos independientes realizados en triplicado ($n=6$) y se representan como porcentaje del control (100%). La significancia estadística de las diferencias con respecto al control se determinaron mediante la prueba *t* de Student's (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$). GT, Genotipo viral.

identificación de inhibidores específicos de la entrada viral. Las HCV_{pp} que expresan las glicoproteínas de la envuelta de la cepa JFH-1, genotipo 2a, son particularmente susceptibles a la inhibición mediada por hidroxicina, benztropina y perfenacina (Figura R5). El tratamiento con perfenacina inhibe de manera significativa la eficiencia de infección de las HCV_{pp} de los genotipos 1 al 4 (de 3 a 5 veces con respecto al control DMSO, respectivamente) (Figura R5A). Esta inhibición, aunque significativa, es sólo marginal para las HCV_{pp} del genotipo 5 y de las VSV_{pp} (disminución en la eficiencia de infección del 16% y 28% con respecto al control, respectivamente). En presencia de hidroxicina (5 μ M), la eficiencia de infección de las HCV_{pp} del genotipo 2 disminuye de manera muy significativa con respecto al tratamiento control; esta disminución, aunque significativa, es sólo parcial (menos del 30% respecto del control) para las HCV_{pp} de los

genotipos 1, 3 y 4 (Figura R5B). Un aumento en la concentración de hidroxicina (25 μ M) reduce la eficiencia de infección de las HCV_{pp} de los genotipos 1, 3 y 4 en aproximadamente un 80% respecto del control (Figura R5B). En el caso de benztropina, ésta inhibe de manera significativa la entrada de las HCV_{pp} de los genotipos 1 al 4 independientemente de su concentración (Figura R5C). El tratamiento con benztropina a 15 μ M inhibe de manera significativa, aunque de forma marginal, la entrada de las HCV_{pp} del genotipo 5 (Figura R5C). En conjunto, estos resultados indican que los compuestos seleccionados inhiben de manera eficaz y selectiva la entrada de HCV en la célula hospedadora a pesar de las diferencias observadas entre genotipos en cuanto a la eficacia de inhibición.

R1.6.- La entrada de la cepa JFH-1 de HCV, genotipo 2a, en la célula hospedadora es especialmente susceptible a la actividad antiviral de hidroxicina

Para confirmar que las HCV_{pp} que expresan las glicoproteínas de la envuelta de la cepa JFH-1, genotipo 2a, son particularmente susceptibles a la actividad antiviral de hidroxicina (Figuras R5B) se procedió a evaluar la propagación de virus de diferentes genotipos en presencia de los compuestos de interés. Para ello, se inocularon células Huh-7.5.1 clon-2 a baja multiplicidad (MDI de 0.01) en presencia de los diferentes compuestos (sección M2.3.2) con el virus JFH-1 y los virus quimera H77C3-JFH1 y Con1C3-JFH1, que expresan las proteínas estructurales de los genotipos 2a (JFH-1), 1a (H77) y 1b (Con1), respectivamente (sección M2.1). A día 6 post-infección, se

recogieron extractos celulares para determinar los niveles de RNA viral intracelular mediante RT-PCR cuantitativa (sección M9.2). El tratamiento con hidroxicina provoca una reducción significativa de más de 4 órdenes de magnitud respecto del control (DMSO) en los niveles intracelulares de RNA viral de la cepa JFH-1 (Figura R6). Esta reducción, aunque significativa, es sólo marginal en el caso de los virus quimera H77C3-JFH1 y Con1C3-JFH1. Benztropina y perfenacina también reducen la acumulación intracelular de RNA viral de manera

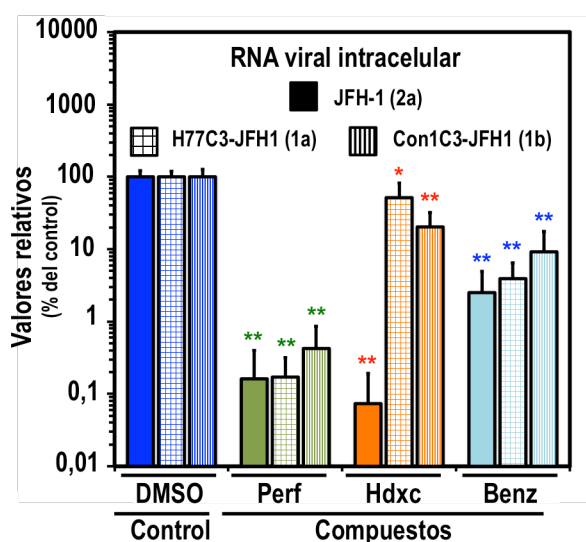


Figura R6. Hidroxicina presenta actividad antiviral selectiva frente a virus del genotipo 2 de HCV. Se inocularon células Huh-7.5.1 clon-2 con el virus JFH-1 o los virus quimera H77C3-JFH1 y Con1C3-JFH1 (MDI de 0.01) en presencia de perfenacina (5 μ M), hidroxicina (5 μ M), benztropina (7.5 μ M) o el control DMSO. A día 6 post-inoculación, se recogieron extractos de células infectadas para determinar los niveles intracelulares de RNA viral mediante RT-PCR cuantitativa. Los datos se muestran como valor promedio y desviación estándar de los resultados obtenidos en dos experimentos independientes realizados en triplicado ($n=6$) y se expresan como porcentaje del control (100%). La significancia estadística de las diferencias con respecto al control se determinaron mediante la prueba *t* de Student's (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$).

significativa con descensos de 1 y 3 órdenes de magnitud respecto del control, respectivamente (Figura R6). No obstante, el tratamiento con estos dos fármacos no da lugar a diferencias en la susceptibilidad a la infección por los distintos virus.

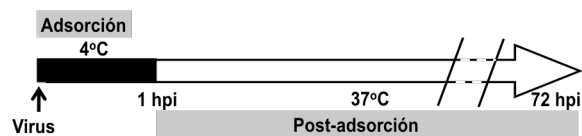
En conjunto, estos resultados indican que el genotipo 2 de HCV es el más susceptible a la inhibición provocada por el tratamiento con hidroxicina corroborando la observación realizada en los ensayos de infección con HCV_{pp} (Figura R5B). Además, refuerzan la hipótesis de que este compuesto tiene como diana un paso del ciclo infeccioso del virus de la hepatitis C mediado por las glicoproteínas de la envuelta.

R1.7.- La infección con la cepa JFH-1 de HCV está bloqueada en un paso posterior a la adsorción del virus a la célula hospedadora

Todos los resultados mostrados hasta el momento sugieren que hidroxicina, benztropina y perfenacina inhiben la infección por HCV a nivel de su entrada en la célula hospedadora. La entrada viral es un proceso complejo que requiere de la adsorción del virus a la célula hospedadora y su posterior internalización (Lindenbach y Rice 2013; Ploss y Evans 2012). Para determinar qué paso de la entrada viral se encuentra inhibido por estos compuestos, se inocularon células Huh-7 con distintas diluciones del virus D183v, a 4°C, y en presencia o ausencia de los compuestos de interés según se describe en la sección M13.5 (Figura R7A). Este experimento se basa en el principio de que la adsorción del virus puede tener lugar a 4°C, pero no su internalización (Tscherne y col., 2006). A 72 hpi, se determinó la eficiencia de infección mediante

determinación del título viral por inmunofluorescencia y recuento de focos de infección en las diferentes diluciones (Figura R7B).

A



B

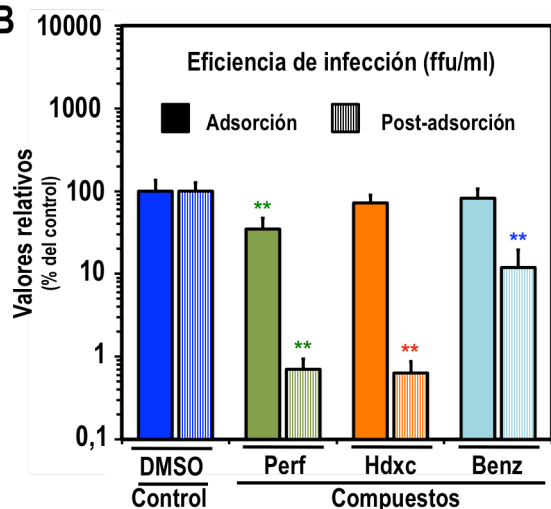


Figura R7. Hidroxicina y benztropina inhiben la entrada de HCV en un paso posterior a su adsorción a la célula hospedadora. (A) Se inocularon células Huh-7 con el virus D183v (MDI de 10), a 4°C y en presencia o ausencia de los compuestos de interés (perfenacina (5 µM), hidroxicina (5 µM), benztropina (7.5 µM) o el control DMSO) para analizar su impacto sobre la adsorción viral o eventos posteriores a dicha adsorción, respectivamente. A 1 hpi, las células se lavaron con PBS y se incubaron con nueva solución de cultivo durante 72 horas, en ausencia de compuestos (impacto sobre la adsorción viral) o en su presencia (impacto sobre eventos post-adsorción) (sección M13.5). (B) Eficiencia de infección del virus D183v (ffu/ml). A 72 hpi, se recogieron los sobrenadantes para determinar los títulos de infectividad extracelular mediante dilución límite, inmunomicroscopía de fluorescencia y recuento de focos de infección (sección M2.2.4). Los datos se muestran como valor

promedio y desviación estándar de los resultados obtenidos en dos experimentos independientes realizados en triplicado ($n=6$). Todos los valores se expresan como porcentaje del control (100%). La significancia estadística de las diferencias con respecto al control se determinaron mediante la prueba t de Student's (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$). *Hdxc*, hidroxicina; *Perf*, perfenacina; *Benz*, benztropina.

Cuando los compuestos están presentes durante la adsorción del virus a la célula hospedadora, los títulos de infectividad extracelular en las líneas celulares tratadas con hidroxicina y benztropina son comparables al control DMSO (Figura R7B). La presencia de perfenacina en la solución de cultivo disminuye de manera significativa, aunque marginal, la eficiencia de infección de JFH-1. Estos resultados sugieren que hidroxicina y benztropina no interfieren con la estabilidad de la partícula viral o la unión física del virión a la célula hospedadora. Cuando los compuestos se añaden durante el proceso de internalización del virus, los títulos de infectividad extracelular descienden significativamente, entre 1 y 2 órdenes de magnitud, con respecto al control DMSO en las células tratadas con benztropina e hidroxicina y perfenacina, respectivamente, indicando que estos compuestos bloquean la infección por HCV en un paso posterior a la adsorción de la partícula viral (Figura R7B).

En resumen, hemos identificado hidroxicina y benztropina como dos nuevos fármacos de uso clínico con potencial para un segundo uso frente a HCV. Estos compuestos inhiben la entrada del virus de la hepatitis C

en la célula hospedadora en un paso posterior a la adsorción de la partícula viral.

R2.- Caracterización de un factor celular implicado en la regulación del metabolismo de glicero- y fosfolípidos (LPIN1) durante la infección por el virus de la hepatitis C

La mayoría de pasos del ciclo replicativo del virus de la hepatitis C dependen del metabolismo lipídico de la célula hospedadora. La infección por HCV además induce cambios importantes en la homeostasis de lípidos y lipoproteínas celulares. Por lo tanto, aquellos factores celulares que juegan algún papel en el metabolismo lipídico celular y que son necesarios para la infección por el virus de la hepatitis C resultan interesantes como potenciales dianas de intervención antiviral.

Uno de estos factores celulares es la proteína LPIN1. Datos preliminares del laboratorio ponen de manifiesto que los niveles de mensajero de LPIN1 se ven incrementados en 1.6 veces durante la infección por el virus de la hepatitis C en líneas de hepatoma humano. Por otra parte, la literatura sugiere que LPIN1 juega un papel central como modulador del metabolismo celular de lípidos y lipoproteínas.

Con el fin de entender mejor la relación existente entre el metabolismo lipídico celular y la infección por el virus de la hepatitis C, hemos determinado el papel de la proteína LPIN1 durante el ciclo de vida de este virus.

R.2.1.- La infección por el virus de la hepatitis C interfiere en la regulación de la expresión de LPIN1

Ensayos realizados por diferentes laboratorios (MacPherson y col., 2011; Luna y col., 2015) ponen de manifiesto una inducción en los niveles de mRNA de LPIN1 como consecuencia de la infección por HCV (Tabla R3). Para comprobar que estos resultados son reproducibles en nuestras manos, inoculamos células Huh-7 a alta multiplicidad (MDI de 10) con el virus D183v y, a distintos tiempos post-infección (24, 48 y 72 horas), recogimos extractos celulares para su análisis mediante RT-PCR cuantitativa (sección M9.2). En la Figura R8 se representan dos experimentos independientes en los que se observa un aumento en los niveles de RNA mensajero de LPIN1 a medida que progresa la infección por HCV.

Observamos una inducción máxima promedio en los niveles de RNA mensajero de LPIN1 de 1.6 veces como consecuencia de la

infección por el virus de la hepatitis C ($n=6$) (ver Tabla R3), incremento que es comparable al observado en (MacPherson y col., 2011) y que se detectó mediante el empleo de microarrays en un modelo de infección también basado en células Huh-7 (Tabla R3).

Dado que los trabajos anteriores no verificaron esta relación a nivel de proteína, analizamos los niveles de expresión de LPIN1 mediante Western Blot a los tiempos post-infección anteriormente indicados y observamos una inducción máxima comparable a la obtenida a nivel de mensajero (inducción máxima promedio de 1.6 veces; $n=6$) (datos no mostrados). En conjunto, estos resultados indican que la infección por HCV interfiere en la regulación de la expresión de LPIN1.

Publicación	PMID	Método	mRNA	Comparación	Niveles de inducción
Mc Pherson y col., Plos One 2011	22046242	Hibridación microarray	LPIN1	Huh-7 vs Huh-7i	1,78
				Huh-7.5.1c2 vs Huh-7.5.1c2i	1,98
				Huh-7.5.1 vs Huh-7.5.1i	2,76
Luna y col., Cell 2015	25768906	RNAseq (GSE64677)	LPIN1	Mock72 vs HCV72	3,09
				Mock96 vs HCV96	3,14
Mingorance y col., Tesis Doctoral 2015		RT-qPCR	LPIN1	Huh-7 vs Huh-7i	1,62

Tabla R3. Niveles de inducción del mRNA de LPIN1 durante la infección por el virus de la hepatitis C. Se muestran los resultados obtenidos por diferentes laboratorios, en las líneas celulares de hepatoma humano indicadas, empleando metodologías diferentes. *Huh-7i*, línea celular Huh-7 infectada con HCV; *Huh-7.5.1c2i*, línea celular Huh-7.5.1 clon-2 infectada con HCV; *Mock*, línea celular Huh-7.5; *HCV72*, línea celular Huh-7.5 infectada con HCV a 72 horas post-infección; *PMID*, Identificador en Pubmed de la publicación correspondiente.

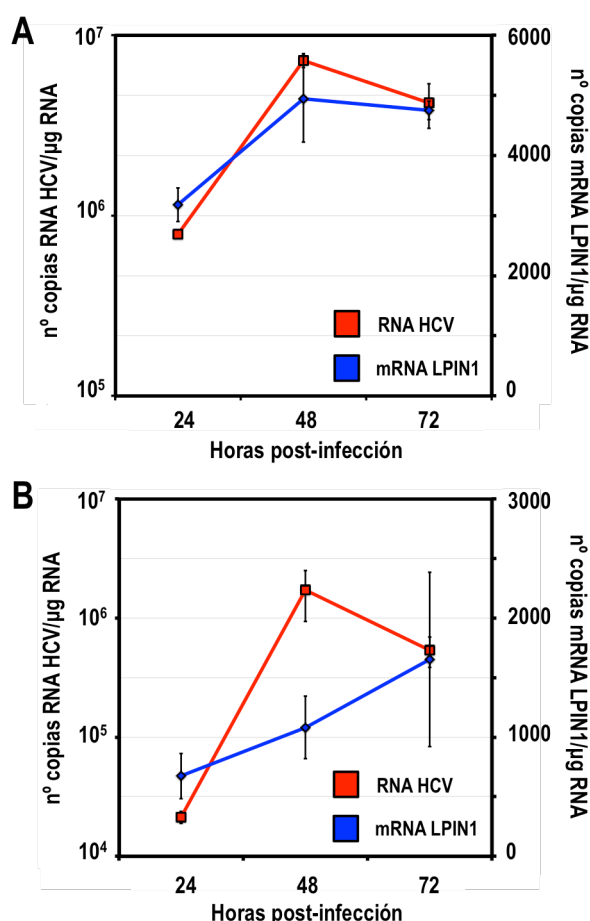


Figura R8. Inducción de los niveles de mRNA de LPIN1 durante la infección por el virus de la hepatitis C. Se inocularon células Huh-7 con el virus D183v (MDI de 10) y, a los tiempos post-infección indicados, se recogieron extractos de células infectadas para determinar los niveles de mRNA de LPIN1 (azul) y de RNA del virus de la hepatitis C (rojo) mediante RT-PCR cuantitativa (sección M9.2). Se representan dos cinéticas de infección con progresión diferente. Todos los valores se expresan como porcentaje del control (100%). Los datos son representativos de dos experimentos independientes realizados en triplicado ($n=3$) y se muestran como valor promedio y error promedio de la n correspondiente.

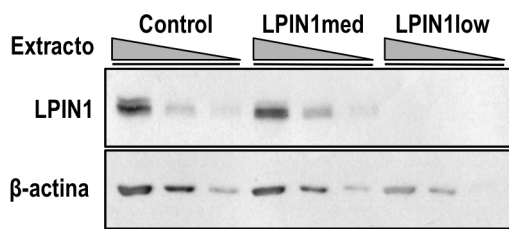
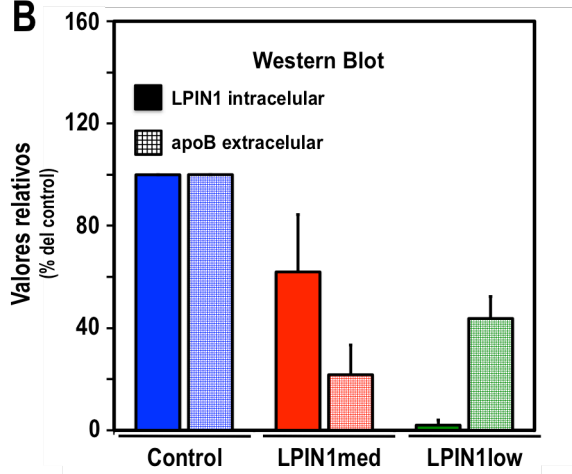
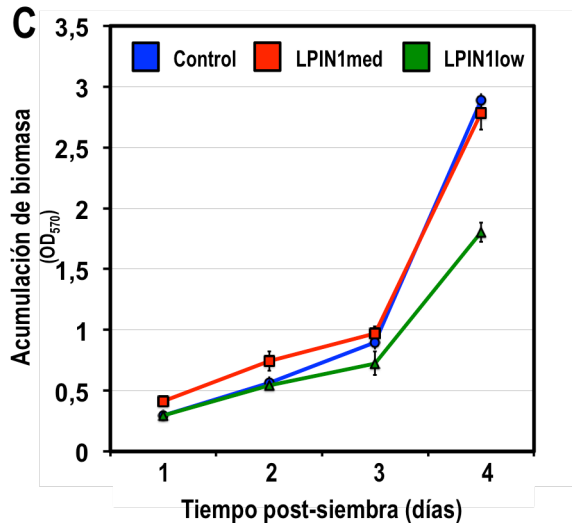
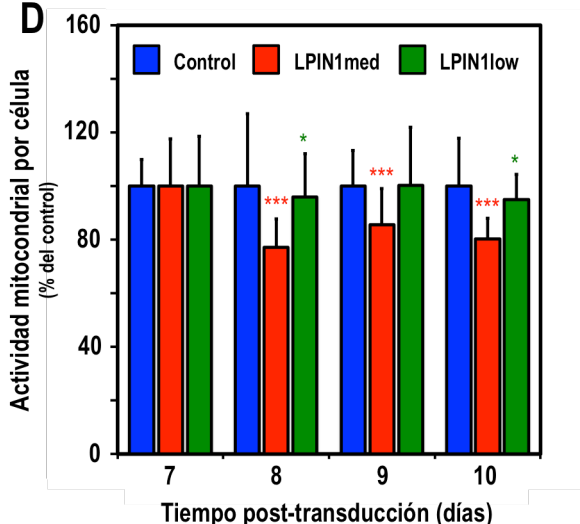
R2.2.- Caracterización del silenciamiento de LPIN1 en células de hepatoma humano (Huh-7)

Para caracterizar el papel de LPIN1 durante la infección por el virus de la hepatitis

C, se generaron líneas celulares de hepatoma humano (Huh-7) que fueran deficientes en la expresión de dicha proteína. El silenciamiento estable de LPIN1 se realizó mediante interferencia de RNA (RNAi) empleando vectores lentivirales para la expresión de short-hairpin RNA específicos frente al RNA mensajero de LPIN1, cuya generación se describe en la sección M5.2.

La obtención de líneas celulares con el gen *lpin1* silenciado se llevó a cabo mediante transducción de células Huh-7 con cuatro construcciones lentivirales que expresan un shRNA específico frente al mRNA de LPIN1 o un vector lentiviral control que expresa un shRNA sin diana conocida en el genoma humano (shRNA-Ctrl). De los cuatro silenciadores específicos frente al mRNA de LPIN1, dos (shRNA-1650 y shRNA-1842) se descartaron por dar lugar a efectos indeseados sobre las células transducidas. Los silenciadores seleccionados fueron el shRNA-248 y el shRNA-1073. Para facilitar la comprensión del texto, en adelante, las líneas celulares transducidas con los silenciadores shRNA-248, shRNA-1073 y shRNA-Ctrl serán definidas como células LPIN1med, células LPIN1low y células control, respectivamente, atendiendo a los niveles de expresión de LPIN1 en cada una de ellas (Figuras R9A y B).

A distintos tiempos post-transducción, se analizaron los niveles de expresión de LPIN1 mediante Western Blot (sección M10) alcanzándose, de manera consistente, un nivel óptimo de silenciamiento a día 6-7 post-transducción. Como se indica en las Figuras R9A y R9B, las células LPIN1med muestran una reducción parcial pero consistente en los niveles de expresión de LPIN1 con niveles de acumulación de esta proteína del 70% ($61.94 \pm 22,37\%$; $n=4$) respecto de la línea celular

A**B****C****D****Figura R9. Caracterización del silenciamiento de LPIN1 en células de hepatoma humano.**

Se transdujeron células Huh-7 con construcciones lentivirales que expresan shRNAs específicos de LPIN1 (shRNA-248 o shRNA-1073) o un shRNA control (Tabla M4) y, a día 6-7 post-transducción, se recogieron extractos y sobrenadantes de las distintas líneas celulares para determinar el nivel de silenciamiento de LPIN1 y los niveles de secreción de apoB mediante Western Blot y el empleo de anticuerpos específicos. Se utilizaron β -actina intracelular y α -1-antitripsina extracelular, respectivamente, como controles de carga. (A) Western Blot frente a LPIN1 representativo de un experimento de silenciamiento génico. (B) Niveles de LPIN1 intracelulares y de apoB extracelulares determinados en base a la señal de cada una de estas proteínas normalizadas por sus correspondientes controles de carga y expresados como valor promedio y error promedio de cuatro experimentos independientes ($n=4$). A los tiempos post-transducción indicados se determinaron (C) la capacidad de proliferación de las distintas líneas celulares por acumulación de biomasa y (D) su actividad mitocondrial mediante ensayo de MTT. En (C) y (D), los datos son representativos de, al menos, dos experimentos independientes ($n>6$) y se muestran como valor promedio y desviación estándar de la n correspondiente. Todos los valores se expresan como porcentaje del control (100%). La significancia estadística de las diferencias respecto del control se determinaron mediante la prueba t de Student's (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.005$).

control. Las células LPIN1low exhiben una reducción más marcada en la expresión de LPIN1 con niveles de acumulación del 2% ($2.00 \pm 2.12\%$; $n=4$).

Verificado el silenciamiento de LPIN1, quisimos determinar el impacto que éste podría tener sobre la capacidad proliferativa y la viabilidad de nuestras células. La capacidad de proliferación de las diferentes líneas celulares se evaluó mediante estimación de la acumulación de biomasa de las mismas a lo largo del tiempo a través del ensayo

colorimétrico descrito en la sección M12.1. En la Figura R9C, se muestran unos niveles de acumulación de biomasa que sugieren una tasa de proliferación comparable para todas las líneas celulares a 72 horas post-siembr (día 9 post-transducción), con una reducción parcial pero consistente en la capacidad de proliferación de las células LPIN1low a 96 horas post-siembr (día 10 post-transducción). Podemos concluir que el silenciamiento mediado por los distintos shRNAs no provoca diferencias importantes en la capacidad de proliferación de las líneas celulares deficientes en LPIN1. Dada la ausencia de diferencias en la capacidad de proliferación entre las distintas líneas celulares entre los días 7 y 9 post-transducción, todos los experimentos se realizaron en ese intervalo de tiempo.

Asimismo, se estudió la actividad mitocondrial de estas líneas celulares como parámetro indicador de posibles alteraciones del metabolismo celular asociadas al silenciamiento de LPIN1, mediante un ensayo colorimétrico basado en MTT (sección M12.2). Tal y como se indica en la Figura R9D, las células LPIN1med muestran una reducción consistente del 20% en su actividad mitocondrial comparadas con la línea celular control, aunque esto no parece tener un impacto sobre su capacidad de proliferación dado que presentan un perfil de crecimiento comparable al de las células control (Figura R9C). Las células LPIN1low muestran una reducción significativa, menor del 5% con respecto al control, en su actividad mitocondrial. En conjunto, estos resultados sugieren que la menor actividad mitocondrial mostrada por las células LPIN1med no es debida al silenciamiento de LPIN1 sino a un efecto colateral (off-target) de dicho silenciador.

El silenciamiento de LPIN1 da lugar a una reducción significativa en la producción de lipoproteínas que contienen apoB (VLDL) (Bou Khalil y col., 2009). Con objeto de verificar si la expresión reducida de LPIN1 tiene consecuencias a nivel funcional analizamos la capacidad de producción de VLDL en las líneas celulares LPIN1med y LPIN1low. Para ello, se recogieron sobrenadantes de células en las que habíamos verificado el silenciamiento de LPIN1 (Figura R9A) para su análisis mediante Western Blot empleando un anticuerpo anti-apoB. Como se indica en la Figura R9B, los niveles de secreción de apoB disminuyen de manera comparable entre las líneas LPIN1med y LPIN1low con respecto a la línea celular control. No obstante, el descenso observado en las células LPIN1med resulta desproporcionado atendiendo al grado de silenciamiento de LPIN1 en las mismas. Estos datos confirman que los niveles intracelulares de LPIN1 son limitantes para la producción de VLDL y que incluso una pequeña reducción en sus niveles de expresión (LPIN1med; reducción del 40% en los niveles de expresión de LPIN1 respecto del control) es suficiente para tener un impacto significativo sobre la biosíntesis de VLDL (reducción hasta el $21.73 \pm 11.7\%$ respecto del control en los niveles de secreción de apoB).

R2.3.- Papel del factor celular LPIN1 en la infección por el virus de la hepatitis C

Con el fin de evaluar el impacto del silenciamiento de LPIN1 en la infección por el virus de la hepatitis C, se llevaron a cabo ensayos de infección de ciclo único en las líneas celulares control y silenciadas para

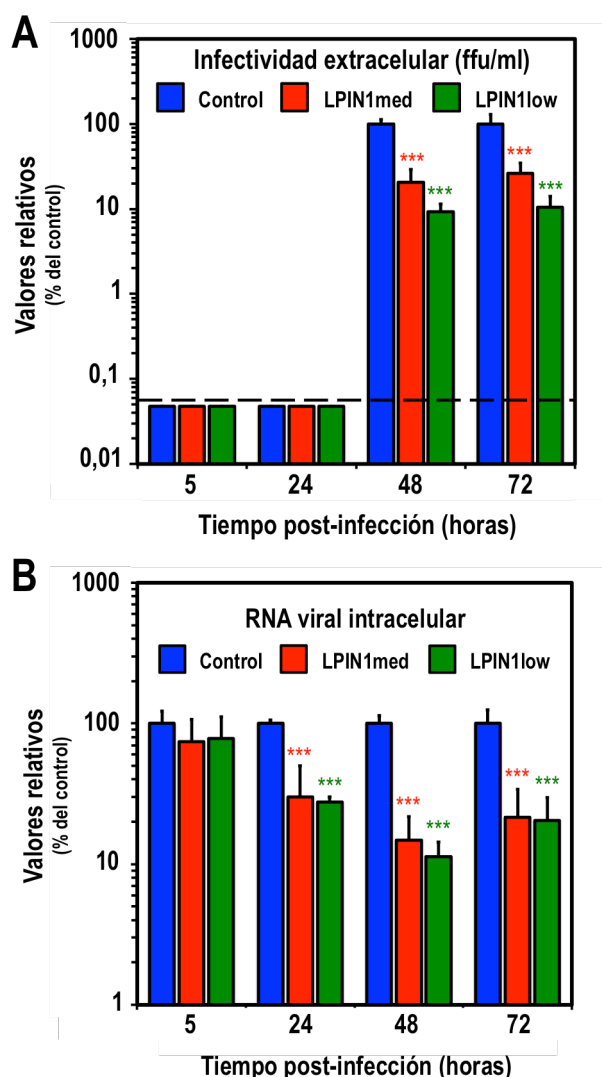


Figura R10. Los niveles celulares de LPIN1 son limitantes para la infección por el virus de la hepatitis C. Se inocularon células Huh-7 control y deficientes en LPIN1 con el virus D183v (MDI de 10) y, a los tiempos post-infección indicados, se recogieron sobrenadantes y extractos de células infectadas para determinar los títulos de infectividad extracelular (A) mediante dilución límite e inmunomicroscopía de fluorescencia (sección M2.2.4) y los niveles intracelulares de RNA viral (B) mediante RT-PCR cuantitativa. (A) Producción de progenie infecciosa determinada a partir de los títulos de infectividad extracelular (ffu/ml). El límite de detección se muestra como una línea negra discontinua. (B) Los niveles normalizados de RNA viral intracelular se determinaron según se describe en la sección M9.2. Los datos se expresan como valor promedio y desviación estándar de dos experimentos independientes realizados en triplicado ($n=6$). Todos los valores se expresan como porcentaje del control (100%). La

significancia estadística de las diferencias respecto del control se determinaron mediante la prueba t de Student's (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.005$).

LPIN1, LPIN1med y LPIN1low. Las diferentes líneas celulares se inocularon con el virus D183v a una MDI de 10 siguiendo la metodología descrita en la sección M2.3.1. A distintos tiempos post-infección, se recogieron muestras de sobrenadantes y de células infectadas. Los sobrenadantes se titularon mediante dilución límite, inmunofluorescencia y recuento del número de focos de infección (sección M2.2.4) para determinar los títulos de infectividad extracelular asociados. Los resultados de la cinética de infección se muestran en la Figura R10A. En todos los casos, a 5 y 24 hpi, la producción de progenie viral está por debajo del límite de detección (línea negra discontinua, Figura R10A). Por el contrario, a 48 y 72 hpi, los títulos de infectividad extracelular reflejan una reducción de aproximadamente un orden de magnitud respecto del control tanto en las células LPIN1med como LPIN1low (Figura R10A).

Las muestras de células infectadas se emplearon para determinar los niveles de RNA viral intracelular mediante RT-PCR cuantitativa (sección M9.2). A 5 hpi no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las distintas líneas celulares en la acumulación de RNA viral por célula (Figura R10B), por lo que podemos considerar que tanto el tamaño del inóculo viral como la adsorción del virus a la célula diana fueron comparables en todos los casos. Sin embargo, a 24, 48 y 72 hpi, la disminución en la acumulación intracelular de RNA viral es comparable a la observada en los títulos de

infectividad extracelular (Figura R10A) tanto en las células LPIN1med como LPIN1low (Figura R10B).

En conjunto, estos resultados sugieren que alguno de los pasos tempranos del ciclo infectivo de HCV que dan lugar a la acumulación del RNA viral podría ser dependiente de LPIN1. Además, indican que una pequeña reducción en los niveles de expresión de LPIN1 (LPIN1med; Figuras R9A-B) es suficiente para provocar una reducción significativa en los títulos de infectividad extracelular y en la acumulación intracelular de RNA viral (Figura R10A y B), de forma análoga a lo observado con la producción de VLDL (Figura R9B).

R2.4.- La infección con HCV_{TCPs} se ve afectada por el silenciamiento de LPIN1

Una estrategia alternativa para comprobar que LPIN1 podría estar jugando un papel importante en una fase temprana del ciclo replicativo del virus durante la infección aguda, entendiendo por fase temprana la entrada del virus a la célula y la traducción-replicación de genes virales, se basa en el empleo de HCV_{TCPs} (sección M4) cuya eficiencia de infección es proporcional a la expresión del gen reportero de luciferasa presente en su genoma.

Siguiendo la metodología descrita en la sección M4, las células LPIN1med, LPIN1low y control se inoculaban con HCV_{TCPs} y, a 48 hpi, se determinaron los niveles intracelulares de actividad luciferasa (ver sección M6).

Las líneas celulares control tratadas con el inhibidor de entrada hidroxicina (10 μ M) (sección R1.5) o con el inhibidor de replicación 2mAde (10 μ M) muestran una

reducción de, al menos, 50 veces en los niveles de actividad luciferasa con respecto al control lo que indica que la acumulación de luciferasa, tras la infección con HCV_{TCPs}, depende de los procesos de entrada y replicación viral (Figura R11).

En el caso de las células LPIN1med, la eficiencia de infección por HCV_{TCPs} se reduce hasta cerca del 20% ($21.27 \pm 5.97\%$; $n=36$) respecto de la línea celular control. Esta disminución es más acusada en la línea LPIN1low en la que se detecta una acumulación intracelular de luciferasa de menos del 10% ($9.64 \pm 4.45\%$; $n=36$) (Figura R11), en concordancia con los niveles de

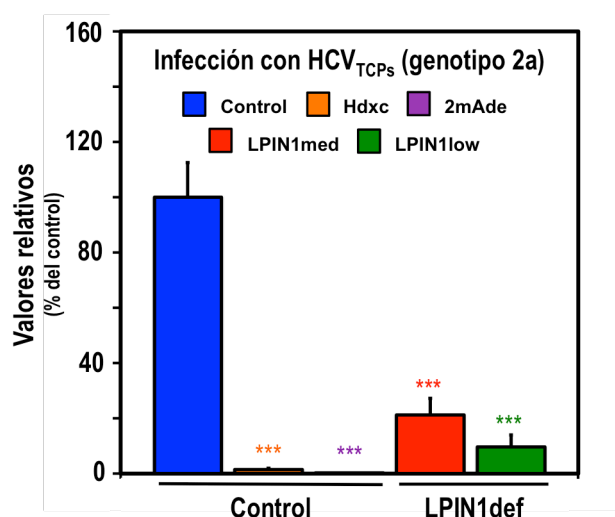


Figura R11. Los niveles celulares de LPIN1 son limitantes para la infección por HCV_{TCPs}. Se inoculaban células Huh-7 control y deficientes en LPIN1 con HCV_{TCPs} (genotipo 2a) y, a 48 hpi, se determinaron los niveles de actividad luciferasa (sección M6). Adicionalmente, se incluyeron dos líneas de células control tratadas con hidroxicina (10 μ M) y 2mAde (10 μ M) como controles positivos de inhibición. Los datos se muestran como valor promedio y desviación estándar de ocho experimentos independientes ($n=36$). Todos los valores se expresan como porcentaje del control (100%). La significancia estadística de las diferencias respecto del control se determinaron mediante la prueba *t* de Student's (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.005$). Hdx, hidroxicina.

expresión de LPIN1 existente en cada una de ellas (Figura R9A y B).

Estos resultados sugieren que un estadio temprano de la infección por el virus de la hepatitis C (entrada del virión, traducción o replicación del genoma viral) podría estar afectado por los niveles de expresión de LPIN1 confirmando la observación realizada durante los ensayos de infección de ciclo único (Figura R10).

R2.5.- El efecto del silenciamiento de LPIN1 en la infección por HCV no es genotipo-dependiente

Con el fin de extender nuestras observaciones a otros genotipos del virus de la hepatitis C, el siguiente objetivo de nuestro trabajo fue evaluar el impacto del silenciamiento de LPIN1 en la infección con la cepa TNcc del genotipo 1a. Dada la baja eficiencia de este virus para propagarse en células Huh-7, los ensayos de infección realizados con la cepa TNcc se llevaron a cabo en la línea celular Huh-7.5 (sección M1) por su mayor permisividad para la replicación de HCV.

En primer lugar, caracterizamos el impacto del silenciamiento de LPIN1 en la línea celular Huh-7.5. Para ello, analizamos a distintos tiempos post-transducción los niveles de expresión de LPIN1 en células Huh-7.5 LPIN1med, LPIN1low y control. Comprobamos que, de manera similar a lo observado en las Figuras R9A-B, el silenciamiento óptimo de LPIN1 se alcanza a día 6-7 post-transducción con niveles de acumulación de esta proteína del 64% en células LPIN1med y de menos del 25% en células LPIN1low (Figura R12A). La capacidad

de proliferación, viabilidad y niveles de secreción de apoB en estas líneas celulares es comparable (resultados no mostrados) a lo observado en células Huh-7 (Figuras R9B-D).

Para verificar que las células Huh-7.5 deficientes en LPIN1 se comportan, a nivel de infección, de manera similar a las Huh-7 (Figura R11), analizamos la eficiencia de infección de HCV_{TCP5} en este contexto. El silenciamiento de LPIN1 reduce la eficiencia de infección de las HCV_{TCP5} hasta valores cercanos al 30% ($34.15 \pm 9.81\%$; $n= 18$) en células LPIN1med y hasta el 4% ($4.20 \pm 1.20\%$; $n= 18$) en células LPIN1low respecto de la línea celular control (Figura R12B), reproduciendo los resultados obtenidos en células Huh-7 (Figura R11). Se emplearon los mismos controles de inhibición que anteriormente (Figura R11) ($n>6$ para Hidroxicina y 2mAd). En conjunto, estos resultados indican que la eficiencia de infección de HCV_{TCP5} se encuentra limitada por los niveles celulares de LPIN1 también en células Huh-7.5 (Figura R12B) siendo la reducción en eficiencia de infección tanto mayor cuanto mayor es el grado de silenciamiento de LPIN1 (LPIN1med vs LPIN1low).

En este contexto, analizamos el papel de LPIN1 durante la infección con el genotipo 1a del virus de la hepatitis C (cepa TNcc). Se inocularon células Huh-7.5 control y células Huh-7.5 deficientes en LPIN1 con la cepa TNcc a baja multiplicidad (MDI entre 0.01 y 0.05) (sección M2.3.2.1) y, a día 3 post-infección, se recogieron extractos de células infectadas para extracción de RNA total (sección M9.1) y su análisis mediante RT-PCR cuantitativa (sección M9.2). Se incluyó una línea de células Huh-7.5 control tratada con 2mAd (10 μ M) para determinar los niveles de RNA viral residual no replicativo ($0.98 \pm 0.48\%$; $n=9$)

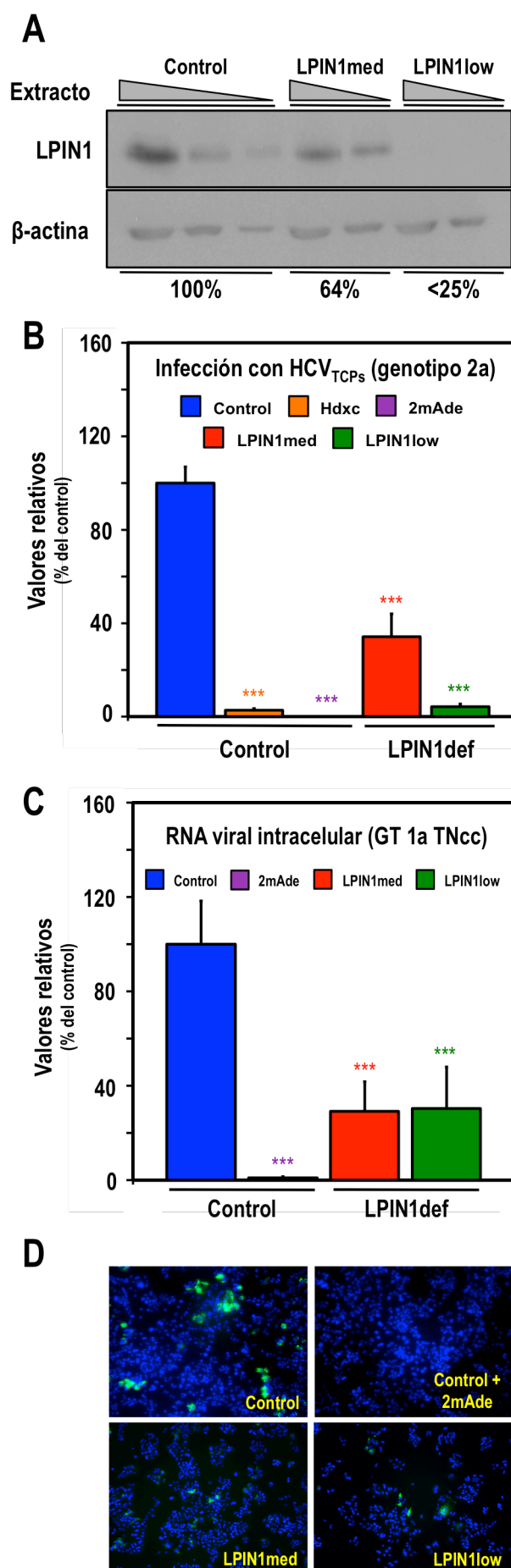


Figura R12. El efecto del silenciamiento de LPIN1 en la infección por HCV no es genotipo-dependiente. Se transdujeron células Huh-7.5 con las construcciones lentivirales que expresan los shRNAs específicos del mRNA de LPIN1 (shRNA-248 o shRNA-1073) o un shRNA control (Tabla M4) y, a día 6-7 post-transducción, se recogieron extractos de las distintas líneas celulares para determinar el nivel de silenciamiento de LPIN1 (A) mediante Western Blot. Se empleó β-actina como control de carga. Los datos son representativos de un único experimento. (B) Infección con HCV_{TCPs} (genotipo 2a). Se inocularon células Huh-7.5 control y deficientes en LPIN1 con HCV_{TCPs} (genotipo 2a) y, a 48 hpi, se determinaron los niveles intracelulares de luciferasa. Hidroxicina (10 μM) y 2mAde (10 μM) se incluyeron como controles positivos de inhibición. Se muestran datos de cinco experimentos independientes (n=18). (C) Infección con la cepa TNcc del genotipo 1a del virus de la hepatitis C. Se inocularon células Huh-7.5 control y deficientes en LPIN1 con el virus TNcc (MDI de 0.01-0.05) y, a día 3 post-infección, se recogieron extractos de células infectadas para determinar los niveles intracelulares de RNA viral mediante RT-PCR cuantitativa. Se empleó 2mAde (10 μM) como control positivo de inhibición. Se muestran datos de tres experimentos independientes realizados en triplicado (n=9). (D) Inmunomicroscopía de fluorescencia en células infectadas con el virus TNcc. Imágenes representativas de dos experimentos independientes (n=2). En los paneles (B) y (C), los datos se muestran como valor promedio y desviación estándar de la n correspondiente. Todos los valores se expresan como porcentaje del control (100%). La significancia estadística de las diferencias respecto del control se determinaron mediante la prueba t de Student's (*, P< 0.05; **, P< 0.01; ***, P< 0.005). Hdx, hidroxicina; GT, Genotipo viral.

(Figura R12C). En las líneas celulares LPIN1med y LPIN1low, los niveles de RNA viral replicativo disminuyen más de 3 veces con respecto a la línea celular control siendo esta reducción estadísticamente significativa y comparable entre ambas líneas celulares (Figura R12C). El

silenciamiento de LPIN1 también provoca una reducción en el número de focos de infección analizados mediante inmunomicroscopía de fluorescencia (Figura R12D). En conjunto, estos resultados sugieren que el silenciamiento de LPIN1 podría estar afectando a algunos de los procesos que conducen a la acumulación de RNA del genotipo 1a del virus de la hepatitis C. Así, podemos concluir que el efecto del silenciamiento de LPIN1 en la infección por HCV no es exclusivo de la cepa JFH-1 (genotipo 2a).

R2.6.- LPIN1 no es limitante para la infección por el coronavirus humano 229E-GFP

A la vista de estos resultados, el siguiente objetivo de nuestro trabajo consistió en evaluar la especificidad del papel funcional de LPIN1 en la infección por HCV. Para ello, se llevaron a cabo ensayos de infección con el CoV 229E-GFP. Al igual que el virus de la hepatitis C, los coronavirus son virus RNA de cadena sencilla y polaridad positiva que forman vesículas de doble membrana en las que se ensambla la replicasa viral (Romero-Brey y Bartenschlager 2014). Asimismo, presentan un ciclo replicativo que depende también de diversos aspectos del metabolismo lipídico de la célula (Nagy y Pogany 2012).

Para estudiar el impacto del silenciamiento de LPIN1 sobre la infección del CoV 229E-GFP, se inocularon células Huh-7 control, LPIN1med y LPIN1low, con diluciones seriadas de un stock de este CoV siguiendo la metodología descrita en la sección M2.4.2. y, a 48 hpi, se determinó la eficiencia relativa de infección mediante dilución límite,

microscopía de fluorescencia y determinación del número de focos de infección (sección M2.4.3.). La infectividad mostrada por el CoV 229E-GFP fue comparable entre las distintas líneas celulares con independencia del grado de silenciamiento de LPIN1 (Figura R13A). El número de focos de infección detectados es similar en las líneas celulares deficientes en LPIN1 y en las células control (Figura R13B) lo que sugiere que LPIN1 no estaría afectando a la capacidad del CoV 229E-GFP para replicar.

En cultivos paralelos, las líneas celulares anteriores se inocularon con HCV_{TCPs} y, a 48 hpi, se analizaron los niveles intracelulares de luciferasa (sección M6). El silenciamiento de LPIN1 provoca una disminución de más de 3 veces en la eficiencia de infección de HCV_{TCPs} en células LPIN1med y de más de 5 veces en células LPIN1low con respecto al control (Figura R13C) lo que confirma que LPIN1 es limitante para la infección por HCV (Figuras R10A, R11 y R13C) pero no para la infección por el CoV 229E-GFP (Figura R13A).

Para descartar que LPIN1 estuviera regulando eventos tardíos del ciclo infectivo del CoV 229E-GFP como el ensamblaje o la formación de progenie infecciosa, se inocularon células Huh-7 control y deficientes en LPIN1 a baja multiplicidad (MDI de 0.01) con el mismo stock de CoV empleado en el ensayo anterior (ver sección M2.4.2) y, a 48 hpi, se recogieron los sobrenadantes para su titulación según se describe en la sección M2.4.3. Los títulos de infectividad extracelular mostraron una reducción marginal pero estadísticamente significativa en la línea celular LPIN1med con respecto a la línea celular control mientras que la producción de progenie infecciosa fue comparable entre la línea control y las células LPIN1low

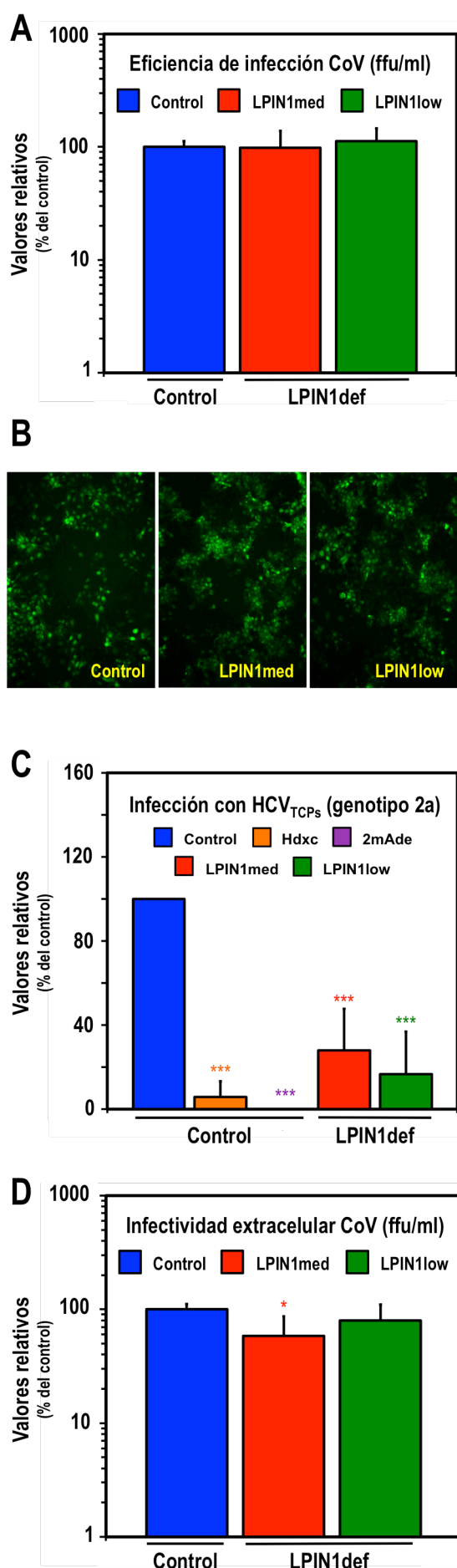


Figura R13. Los niveles celulares de LPIN1 no son limitantes para la infección por el CoV humano 229E-GFP. A día 7 post-transducción, se inocularon células Huh-7 control y deficientes en LPIN1 con el CoV humano 229E-GFP para determinar la eficiencia de infección de este virus (A) y la producción de progenie infecciosa (D). (A) Infección con el CoV 229E-GFP. Las células se inocularon con diluciones seriadas (1:3) del CoV 229E-GFP y, a 48 hpi, se determinaron los títulos de infectividad extracelular (ffu/ml) mediante microscopía de fluorescencia (sección M2.2.4). (B) Microscopía de fluorescencia en células infectadas con el CoV 229E-GFP. La señal de GFP, determinada a 48 hpi, es indicativa de la formación de focos de infección por el CoV 229E-GFP ($n=1$). (C) Infección con HCV_{TCPs} (genotipo 2a del HCV). Se inocularon células Huh-7 control y deficientes en LPIN1 con HCV_{TCPs} en paralelo a los ensayos mostrados en (A) y, a 48 hpi, se determinaron los niveles de actividad luciferasa ($n=6$). (D) Producción de progenie infecciosa por el CoV 229-GFP. Las células se inocularon con el CoV 229-GFP a una MDI de 0.01 y, a 48 hpi, se determinaron los títulos de infectividad extracelular (ffu/ml) mediante inmunomicroscopía de fluorescencia y recuento de focos de infección (sección M2.2.4). Los datos mostrados en (A) y (D) son representativos de dos experimentos independientes ($n=12$). Todos los datos se muestran como valor promedio y desviación estándar de la n correspondiente y se expresan como porcentaje del control (100%). La significancia estadística de las diferencias respecto del control se determinaron mediante la prueba t de Student's (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.005$). Hdx, hidroxicina.

(Figura R13D). En conjunto, estos resultados sugieren que los niveles celulares de LPIN1 no son limitantes para la infección por el CoV 229E-GFP.

R2.7.- Los niveles celulares de LPIN1 no son limitantes para la infección persistente por el virus de la hepatitis C

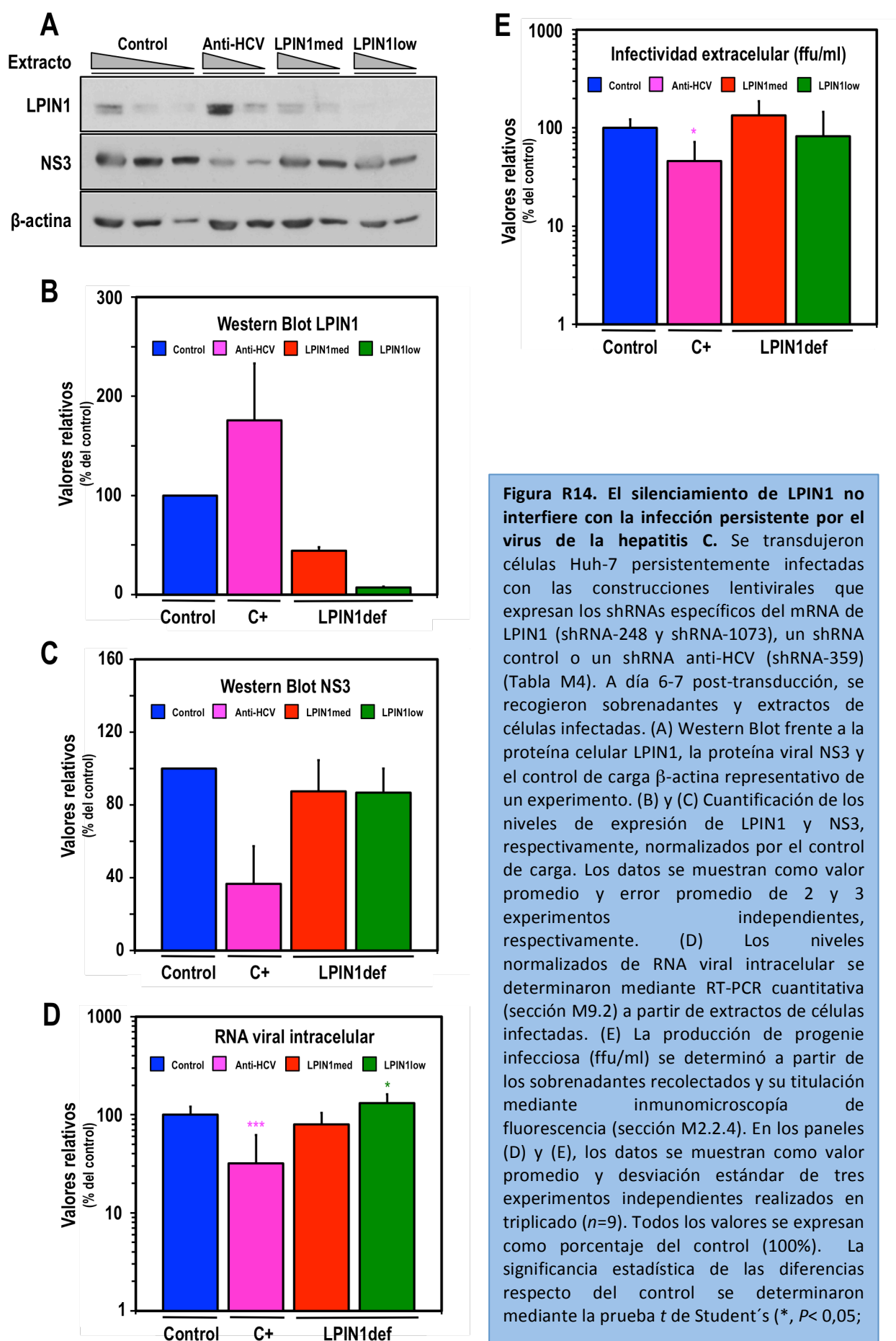
El siguiente objetivo de nuestro trabajo consistió en analizar si LPIN1 juega algún papel en estadios tardíos de la infección por el virus de la hepatitis C empleando un modelo de infección persistente. Se inocularon células Huh-7 a baja multiplicidad (MDI de 0.01) con la cepa JFH1, genotipo 2a, del virus de la hepatitis C según se describe en la sección M2.3.3. Una vez establecida la infección, las células se transdujeron con las construcciones lentivirales que expresan los shRNAs específicos frente al mRNA de LPIN1 (shRNA-248 y shRNA-1073; LPIN1_{med} y LPIN1_{low}), el shRNA-Ctrol descrito anteriormente (sección R2.2) o un shRNA que reconoce la posición nucleotídica 359 del elemento IRES del genoma viral (shRNA-359; Anti-HCV) como control positivo de inhibición (Tabla M4).

A día 7 post-transducción, se verificó el silenciamiento de LPIN1 mediante Western Blot observando niveles de acumulación de esta proteína cercanos al 40% ($44,39 \pm 3.46\%$; $n=3$) en células LPIN1_{med} y menores del 10% ($7.05 \pm 1.15\%$; $n=3$) en células LPIN1_{low} respecto del control (Figuras R14A-B). Sin embargo, se detecta un incremento inesperado en los niveles de acumulación de LPIN1 en las células que expresan el shRNA-359. Con independencia de estos resultados, la acumulación de la proteína viral NS3 fue comparable entre la línea celular control y las células deficientes en LPIN1 (Figuras R14A y R14C) lo que sugiere que los niveles intracelulares de LPIN1 no son limitantes para la replicación viral en el contexto de una infección persistente. Como cabría esperar, en

la línea celular Anti-HCV los niveles de expresión de NS3 disminuyen en casi 3 veces respecto del control (Figura R14C).

Para verificar que la replicación del virus de la hepatitis C no se encuentra limitada por el silenciamiento de LPIN1, analizamos la acumulación intracelular de RNA viral a distintos tiempos post-transducción (ver sección M2.3.3) mediante RT-PCR cuantitativa (sección M9.2). Las líneas celulares deficientes en LPIN1 muestran niveles intracelulares de RNA viral comparables a los de la línea celular control, a pesar del incremento marginal y significativo observado en células LPIN1_{low} (Figura R14D). La acumulación intracelular de RNA viral disminuye de manera significativa en la línea celular Anti-HCV, de manera comparable a lo observado en los niveles de expresión de la proteína NS3 (Figuras R14A y C), que forma parte de la replicasa del virus. Estos datos sugieren que los niveles celulares de LPIN1 no son limitantes para la replicación del RNA viral una vez que la infección por el virus de la hepatitis C se ha establecido. Aunque el tratamiento farmacológico con 2mAde reduce la acumulación intracelular de RNA viral en más de 2 unidades logarítmicas con respecto al control a 48 hpi (ver Figura R4) decidimos emplear, para la realización de estos experimentos, una línea celular transducida con el shRNA-359 (línea celular Anti-HCV) como control positivo de inhibición por adecuarse más al contexto en que se efectúan los mismos. En este caso, la disminución observada en los niveles de RNA viral intracelular, aunque significativa, es moderada (Figura R14D).

Para determinar si el silenciamiento interfiere en la producción de progenie infecciosa, titulamos los sobrenadantes recogidos a distintos tiempos post-



******, $P < 0.01$; *******, $P < 0.005$). *Anti-HCV*, línea celular transducida con el shRNA-359; *C+*, control positivo de inhibición.

transducción siguiendo la metodología descrita en la sección M2.2.4. A diferencia de lo que ocurre en células Huh-7 sin infectar, observamos pequeñas diferencias en el crecimiento de las distintas líneas celulares como consecuencia de la infección persistente por el virus de la hepatitis C y el silenciamiento de LPIN1. Para no infravalorar los títulos de infectividad extracelular, éstos se normalizaron por la cantidad de β -actina determinada para cada línea celular. Los factores de corrección en ningún caso excedieron un factor de 2-3 veces. Una vez corregidos los valores de infectividad, observamos que las líneas celulares deficientes en LPIN1 muestran títulos de infectividad extracelular comparables a los de la línea celular control (Figura R14E). Como cabría esperar atendiendo a los resultados de la Figura R14D, la línea celular *Anti-HCV* muestra un descenso significativo en los títulos de infectividad extracelular con valores inferiores al 50% ($45.83 \pm 25.90\%$; $n=9$) respecto de la línea celular control (Figura R14E). Estos resultados sugieren que LPIN1 no es limitante para la producción de progenie infecciosa.

En conjunto, estos resultados sugieren que LPIN1 no es limitante en el contexto de una infección persistente por el virus de la hepatitis C.

R.2.8. Estudio del papel de LPIN1 en aspectos tempranos de la infección por HCV

Comprobada la dependencia de LPIN1 durante la infección aguda por el virus de la hepatitis C quisimos determinar qué paso o qué pasos de su ciclo replicativo se encontraban limitados por los niveles celulares de esta proteína. Para ello, empleamos una serie de abordajes experimentales sustitutivos que nos permitieron diseccionar los diferentes eventos que se suceden durante los estadios más tempranos de dicho ciclo.

R.2.8.1.- Los niveles celulares de LPIN1 no son limitantes para la entrada viral

Para estudiar el papel de LPIN1 en la entrada del virus de la hepatitis C en la célula hospedadora empleamos el sistema de infección con partículas retrovirales pseudotipadas (o pseudopartículas) que expresan las glicoproteínas de la envuelta del virus de la hepatitis C, genotipo 2a, cepa JFH-1 (*HCV_{pp}*) o la proteína G del virus de la estomatitis vesicular (*VSV_{pp}*), empleadas como control, que se describe en la sección M5.1. A continuación, inoculamos células Huh-7 control y deficientes en LPIN1 con ambos tipos de pseudopartículas y, a 72 hpi, medimos la acumulación intracelular de luciferasa (sección M6). Para revelar el efecto específico sobre la entrada de HCV incluimos una línea de células control tratada con hidroxicina (10 μ M) (sección R1.5). Estos datos de inhibición farmacológica (Figura R15) demuestran ausencia de saturación en la señal de luciferasa detectada. La eficiencia de infección

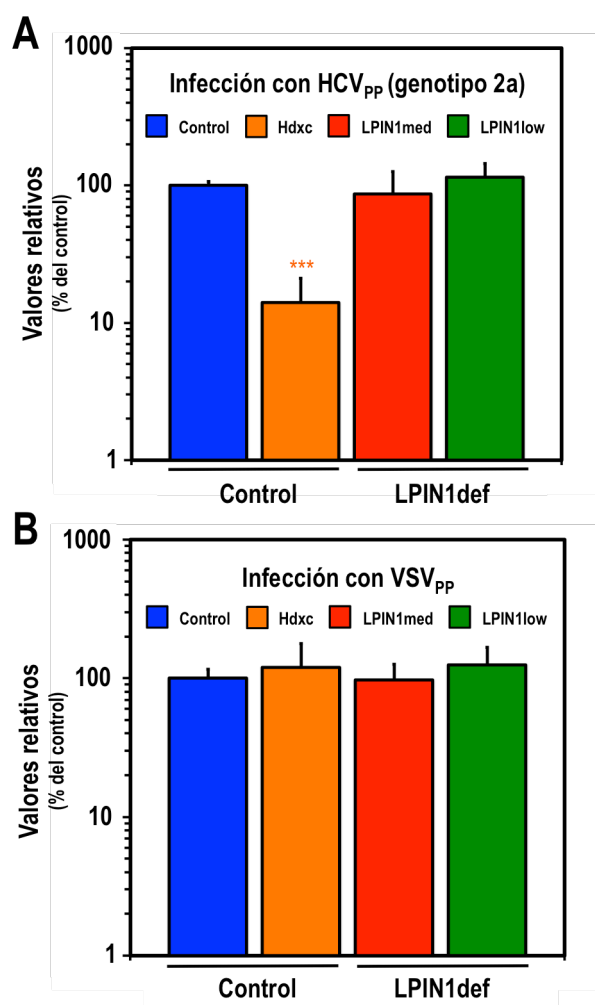


Figura R15. Los niveles celulares de LPIN1 no son limitantes para la entrada viral. Se inocularon células Huh-7 control y deficientes en LPIN1 con partículas pseudotipadas que expresan las glicoproteínas de la envuelta de HCV (cepa JFH-1, genotipo 2a) o de VSV, empleadas como control y, a 72 hpi, se determinaron los niveles de actividad luciferasa (sección M6). Se empleó hidroxycina (10 μ M) como control positivo de inhibición. Los datos se muestran como valor promedio y desviación estándar de cuatro experimentos independientes realizados en triplicado ($n=12$). Todos los valores se expresan como porcentaje del control (100%). La significancia estadística de las diferencias respecto del control se determinaron mediante la prueba *t* de Student's (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.005$). Hdxc, hidroxycina; HCV_{pp}, partículas pseudotipadas que expresan las glicoproteínas de la envuelta de la cepa JFH-1 (genotipo 2a) de HCV; VSV_{pp}, partículas pseudotipadas que expresan la proteína G de la envuelta de VSV.

de HCV_{pp} y VSV_{pp} es comparable en todas las líneas celulares (Figura R15A y B) con independencia de los niveles de expresión de LPIN1 indicando que LPIN1 no es limitante para la entrada del virus de la hepatitis C en la célula hospedadora. Ello sugiere que algún paso posterior, como la traducción de genomas entrantes (traducción primaria) o la iniciación de la replicación, está afectada por el silenciamiento de LPIN1.

R.2.8.2.- El silenciamiento de LPIN1 afecta a la replicación del genoma viral sin alterar la traducción primaria

Para analizar el impacto del silenciamiento de LPIN1 sobre los procesos de traducción primaria y replicación del genoma viral, se transfectaron células Huh-7 control y deficientes en LPIN1 con el replicón subgenómico SGR-JFH1-luc (sección M3) y se determinaron, a distintos tiempos post-transfección, los niveles de actividad luciferasa (sección M6).

Los niveles de expresión de luciferasa a 5 hpt son comparables entre las distintas líneas celulares (Figura R16A) indicando que la traducción primaria no está afectada por el silenciamiento de LPIN1. Estos resultados se confirmaron mediante transfección del replicón subgenómico SGR-JFH1- Δ GND que es defectivo en replicación (sección M3) en células LPIN1med, LPIN1low y células control y analizando los niveles de expresión de luciferasa a 5 hpt (Figura R16B).

La acumulación intracelular de luciferasa en células LPIN1med aumenta marginalmente, aunque de manera significativa, con respecto a la línea celular control (Figura R16B),

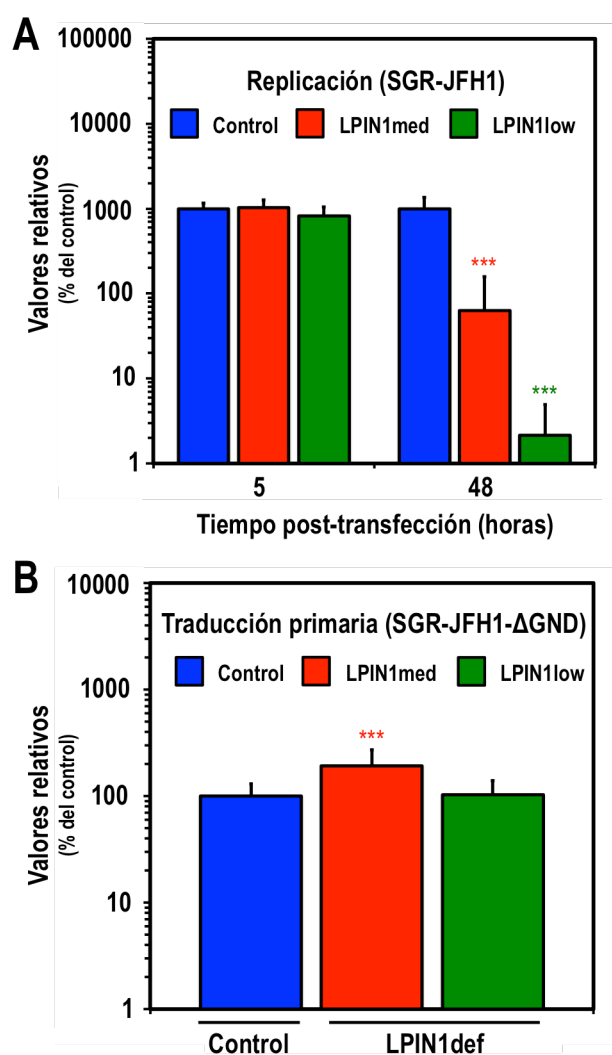


Figura R16. El silenciamiento de LPIN1 afecta a la replicación del genoma viral pero no tiene efecto sobre su traducción primaria. Se transfectaron células Huh-7 control y deficientes en LPIN1 con los replicones SGR-JFH1 (A) o SGR-JFH1-ΔGND (B) y, a los tiempos post-transfección indicados, se determinaron los niveles intracelulares de luciferasa (sección M6). (A) Replicación estimada mediante transfección de un minigenoma competente en replicación. Se empleó 2mAde (10 μM) como control positivo de inhibición (datos no mostrados). (B) Traducción primaria estimada mediante transfección de un minigenoma no-replicativo. En (A) y (B) los datos se muestran como valor promedio y desviación estándar de tres experimentos independientes en triplicado ($n=9$) y se expresan como porcentaje del control (100%). La significancia estadística de las diferencias respecto del control se determinaron mediante la prueba t de Student's (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.005$).

incremento no observado en el ensayo anterior (Figura R16A). La acumulación intracelular de luciferasa determinada a 48 hpt depende de los procesos de traducción primaria y replicación del genoma viral, tal y como queda demostrado por el tratamiento farmacológico con 2mAde (10 μM) que inhibe la replicación viral y, por consiguiente, la acumulación intracelular de luciferasa a 48 hpt (Figura R3C). En las líneas celulares LPIN1med y LPIN1low se detecta una reducción significativa de 1 y más de 2 unidades logarítmicas con respecto al control en los niveles de actividad luciferasa a 48 hpt (Figura R16A), lo que sugiere que el silenciamiento de LPIN1 afecta a la replicación del genoma viral.

Aunque los datos de traducción primaria sugieren que no existen diferencias en la eficiencia de transfección entre las distintas líneas analizadas, realizamos experimentos de control en los que se cotransfectaron el replicón subgenómico y un plásmido que permite la expresión de la luciferasa de *Renilla* bajo un promotor dependiente de la polimerasa II celular. En estos experimentos, se observó una reducción significativa de la señal de luciferasa derivada del replicón y niveles comparables de luciferasa de *Renilla* derivada del plásmido (datos no mostrados), descartando diferencias en los niveles de transfección y verificando que LPIN1 es limitante para el establecimiento de complejos de replicación funcionales.

En conjunto, estos resultados sugieren que LPIN1 no es limitante para la traducción primaria del genoma del virus de la hepatitis C pero sí para su replicación confirmando que la menor acumulación de RNA viral observada en las líneas celulares deficientes en LPIN1 tanto en los ensayos de infección de ciclo único (Figura R10B) como en los ensayos con

partículas transcomplementadas de hepatitis C (Figuras R11 y R13B) se debe a un defecto en el establecimiento y/o funcionamiento del complejo de replicación del virus de la hepatitis C.

En conclusión, LPIN1 es necesaria para la replicación del RNA viral durante una infección aguda con el virus de la hepatitis C, función que parece dispensable en el contexto de una infección persistente.

9. DISCUSIÓN

D1.- Rastreo de compuestos químicos con actividad antiviral frente al virus de la hepatitis C

El sistema de rastreo empleado en esta Tesis Doctoral es un sistema miniaturizado de infección, no sesgado y cuantitativo que reproduce el ciclo replicativo completo del virus de la hepatitis C. Permite el análisis simultáneo de cientos de compuestos en busca de moléculas que inhiben cualquier aspecto del ciclo infectivo, empleando baja multiplicidad de infección, y permitiendo identificar compuestos antivirales no tóxicos con dianas tanto celulares como virales. Estas características contrastan con las de sistemas tradicionales que interrogan librerías químicas mediante ensayos enzimáticos *in vitro* o ensayos basados en células que recapitulan aspectos parciales de la infección, como pueden ser el sistema de replicones para estudios sobre replicación o las HCV_{pp} para el estudio de la entrada viral. Por otro lado, los compuestos químicos que hemos analizado en este trabajo ya han sido aprobados para su uso clínico en el tratamiento de un amplio rango de enfermedades no asociadas a la infección por HCV, por lo que tienen un perfil toxicológico conocido. Ello implica que, en el caso de que alguno de los compuestos muestre actividad antiviral frente al virus de la hepatitis C, la fase I del desarrollo clínico, centrada en determinar un rango seguro de dosificación del compuesto en humanos, estaría superada agilizándose su utilización en clínica y su incorporación al mercado farmacéutico. Esto es importante teniendo en cuenta que más del 70% de los compuestos aprobados en ensayos pre-clínicos no superan la fase I de los ensayos clínicos (Ledford 2011).

En este trabajo, hemos identificado 11

compuestos químicos con actividad antiviral frente a HCV a concentraciones no tóxicas; compuestos que hemos clasificado en tres categorías atendiendo a su estructura y aplicación farmacológica principal descrita (Figura R1). La primera categoría está formada por antidepresivos tricíclicos e incluye tanto fenotiazinas (clorpromacina y perfenacina) como dibenzazepinas (clomipramina, desipramina e imipramina). Atendiendo a su estructura, estos compuestos tienen actividad de base catiónica y se definen como CADs (del inglés, cationic amphiphilic drugs). Entre otras funciones, los CADs actúan interfiriendo con el proceso de maduración de los endosomas (Wang, Rothberg, y Anderson 1993; Kornhuber y col., 2008; Barker y col., 1973; Halliwell 1997) por lo que hemos de considerar la posibilidad de que los compuestos incluidos en este grupo inhiban la infección por HCV a nivel de entrada y, más concretamente, en relación con el proceso de endocitosis. Además, el empleo de perfenacina como control de nuestros experimentos, al describirse recientemente su papel como inhibidor de la infección por HCV (Hu y col., 2014), confirmó que los compuestos de esta categoría interfieren con la entrada de varios genotipos de HCV (Figura R5A). Trabajos previos indican que tanto fenotiazinas como dibenzazepinas inhiben la entrada viral (Gastaminza, Whitten-Bauer, y Chisari 2010), confirmando nuestra hipótesis inicial, así como revelan que las fenotiazinas, al cambiar las propiedades de la membrana endosomal, interfieren con la fusión de membranas inducida por las proteínas virales E1E2 (Chamoun-Emanuelli y col., 2013). También se ha visto que clorpromacina inhibe la endocitosis mediada por clatrina (Wang, Rothberg, y Anderson 1993) y la entrada de

varios virus, entre ellos, el HCV en cultivo celular (Blanchard y col., 2006; Chamoun-Emanuelli y col., 2013). Según nuestros resultados, la concentración a la que perfenacina inhibe la entrada de HCV (Figura R5A) es insuficiente para inhibir la entrada de otros virus que también experimentan endocitosis mediada por clatrina, como VSV o gripe, o virus que fusionan a nivel de membrana plasmática, como RD114, lo que sugiere cierta especificidad en la actividad antiviral de este compuesto. La fusogenicidad de las glicoproteínas E1E2 de HCV depende, en gran medida, de la composición lipídica de las membranas celulares y, por tanto, de su fluidez y permeabilidad (Lavillette y col., 2006). El contenido en colesterol y esfingolípidos de estas membranas modula su curvatura y, con ello, la estructura y orientación de las mismas que queda accesible a las proteínas de fusión del virus (Lavillette y col., 2006). Según Chamoun-Emanuelli y colaboradores, las fenotiazinas podrían interferir con la disposición de los microdominios ricos en colesterol de las membranas celulares impidiendo la fusión de las glicoproteínas de HCV sin que ello afecte, por ejemplo, a la entrada de VSV (Chamoun-Emanuelli y col., 2013), en consonancia con nuestras observaciones (Figura R5A).

En el segundo grupo (Figura R1) se incluyen tamoxifeno, raloxifeno y clomifeno, compuestos que actúan como moduladores selectivos del receptor de estrógenos e inhiben la infección por HCV al interferir con múltiples pasos de su ciclo replicativo (entrada, replicación y/o producción de progenie infecciosa) (Gastaminza, Whitten-Bauer, y Chisari 2010; Murakami y col., 2013; Chamoun-Emanuelli, Pecher, y Chen 2014). Estructuralmente, son similares a los

compuestos del primer grupo ya que se trata de moléculas planas con múltiples anillos aromáticos y una cadena lateral que contiene una amina terciaria, es decir, funcionan como CADs, por lo que se presume para ellos un mecanismo de acción similar al anteriormente indicado como inhibidores de la entrada viral. Además, se ha descrito que tamoxifeno interfiere con la función proviral del receptor alfa de estrógenos (ER α) (Watashi y col., 2007) inhibiendo la formación del complejo de replicación y que raloxifeno, que también inhibe el proceso de replicación (Takeda y col., 2012), mejora la tasa de cura en mujeres postmenopáusicas infectadas con HCV en su uso combinado con PEG-IFN- α y ribavirina, lo que sugiere que el empleo combinado de estos compuestos con otros antivirales podría tener un importante valor terapéutico, al menos en algunas poblaciones de pacientes (Furusyo y col., 2012).

Los compuestos del tercer grupo, hidroxicina y benztropina (Figura R1), inhiben eficientemente la infección viral a concentraciones muy bajas (Figuras R2, R3A-B y 6) sin interferir con la replicación del RNA del virus, ni en ensayos de transfección (Figura R3C) ni en el contexto de una infección persistente (Figura R4). Ello sugiere que el potencial inhibitorio de estos compuestos se manifiesta en un estadio temprano de la infección anterior a la replicación del RNA. Mediante ensayos de infección con partículas retrovirales pseudotipadas (HCV_{pp}) se confirmó la observación previa comprobándose que hidroxicina y benztropina inhiben la entrada de los genotipos 1, 2, 3 y 4 (Figuras R5B-C) y que dicha inhibición tiene lugar en un paso posterior a la adsorción del virus a la célula hospedadora (Figura R7).

Benzotropina es un antagonista del

receptor muscarínico M1 que se emplea en el tratamiento contra la enfermedad de Parkinson (Agundez y col., 2013) ya que actúa a nivel del sistema nervioso central. Su capacidad para traspasar la barrera hematoencefálica, así como las distintas membranas celulares, reside en su estructura que es propia de un CAD (Kornhuber y col., 2008), ya que se trata de una molécula plana con dos anillos aromáticos y una amina terciaria (Figura R1). Los resultados mostrados en esta Tesis Doctoral indican que concentraciones subtóxicas de benztropina (EC_{50} : $0.67 \pm 0.29 \mu M$; CC_{50} : $26.25 \pm 1.76 \mu M$; I.T. de 39) inhiben la entrada de HCV (Figuras R5C y R7). Ésta tiene lugar mediante endocitosis mediada por clatrina seguida de la fusión de la membrana plasmática con la membrana endosomal (Figura I2A-3 y 4), a través de un proceso gobernado por un bajo pH (Meertens, Bertaux, y Dragic 2006). Por su naturaleza hidrofóbica, los CADs -en su forma no ionizada- pueden atravesar fácilmente las distintas membranas celulares, entre otras, la membrana plasmática y la endosomal. Una vez dentro del endosoma, los CADs se cargan positivamente e interaccionan con diferentes fosfolípidos de membrana y enzimas implicadas en el metabolismo lipídico celular (Kornhuber y col., 2008; Halliwell 1997) alterando la disponibilidad de éstos y, con ello, la composición, morfología, fluidez y función de las diferentes membranas celulares. Cambios en la estructura de la membrana endosomal o la inducción de cuerpos lamelares en los lisosomas como consecuencia de un aumento en su contenido en fosfolípidos (Halliwell 1997) afecta a la funcionalidad de estos orgánulos e interfiere con la maduración de los endosomas (Kornhuber y col., 2008; Wang, Rothberg, y

Anderson 1993) dificultando el proceso de endocitosis. Así, presuponemos un mecanismo de acción para la benztropina que sería similar al de los antidepresivos tricíclicos del primer grupo. A pesar de su capacidad para inhibir eficientemente la entrada de los genotipos 1, 2, 3 y 4 a concentraciones relativamente bajas ($15 \mu M$) (Figura R5C), su menor ventana terapéutica en ensayos *in vitro* (Tabla R2) y en pacientes (Carranza y col., 2013) respecto de hidroxicina le relega a un segundo plano como antiviral potencial frente a la infección por HCV.

Hidroxicina es un antagonista del receptor H1 de histaminas que se emplea en el tratamiento de reacciones alérgicas, como antiemético para reducir las náuseas y como ansiolítico. Entre otros, su uso está indicado para el tratamiento del prurito en pacientes con disfunción hepática (Simons y col., 1989). Los resultados mostrados en esta Tesis Doctoral indican que concentraciones subtóxicas de hidroxicina (EC_{50} : $0.26 \pm 0.13 \mu M$; CC_{50} : $0.55 \pm 0.25 \mu M$; I.T. de 178) inhiben eficientemente la entrada de los genotipos 1, 2, 3 y 4 de HCV en la célula hospedadora (Figura R5B), de manera similar a lo observado para la clorciclicina, un análogo estructural de hidroxicina (He y col., 2015). En conjunto, estos resultados sugieren un amplio espectro para ambos fármacos lo que representa una ventaja en el control de la infección por HCV dada la enorme diversidad genética que exhibe este grupo de virus.

La caracterización del mecanismo de acción de la clorciclicina en el ciclo replicativo de HCV y su similitud estructural con la hidroxicina han arrojado luz acerca de su posible diana molecular. Así, se ha comprobado que la clorciclicina inhibe la entrada viral en un estadio tardío previo a la

replicación del RNA (He y col., 2015). En este sentido, Chamoun-Emanuelli y colaboradores han confirmado nuestros resultados con la hidroxicina y demostrado que ambos compuestos inhiben la entrada de HCV en un paso previo a la fusión de las membranas viral y endosomal (Chamoun-Emanuelli, Pecher, y Chen 2014) aunque existen diferencias en cuanto a la interpretación de estos resultados. Mientras que Chamoun-Emanuelli propone un cambio en la localización celular del receptor NPC1L1 como consecuencia de la actividad de hidroxicina y clorciclicina, He y colaboradores no han observado alteración alguna en la distribución celular de NPC1L1 y otros receptores que median en la entrada de HCV, reforzando la idea de que es necesaria más investigación en este sentido.

A pesar de su semejanza estructural con hidroxicina y clorciclicina, no pudimos demostrar actividad antiviral de la cetiricina (datos no mostrados), que constituye el principal metabolito farmacológicamente activo de la hidroxicina, probablemente a causa de su elevada polaridad y la reducida permeabilidad que presentan las células frente a este tipo de compuestos. Resultados similares fueron obtenidos por otro laboratorio (He y col., 2015).

Aunque hidroxicina inhibe eficientemente la entrada del genotipo 2 a bajas concentraciones (5 μ M), ésta debe incrementarse en hasta 5 veces para lograr un efecto inhibitorio comparable frente a los genotipos 1, 3 y 4 (Figura R5B), lo que sugiere la existencia de diferencias intergenotípicas en la susceptibilidad a la inhibición mediada por hidroxicina. La mayor susceptibilidad del genotipo 2 a la acción de hidroxicina sugiere diferencias en el mecanismo de entrada de HCV dependiendo del genotipo viral. Es

posible que las rutas de entrada de los diferentes aislados dependan de factores celulares similares (Ploss y Evans 2012) pero que, en función del aislado, el uso que se hace de cada uno de ellos varíe. En este sentido, recientemente se ha demostrado que diferentes aislados de HCV podrían usar diferentes miembros de la familia de las claudinas en el proceso de entrada viral como una alternativa a la Claudina-1 (Haid y col., 2013) que se sabe que desempeña un papel crucial en la entrada de HCV a nivel tardío (Evans y col., 2007), de manera similar al receptor NPC1L1 (Popescu y col., 2014). Asimismo, se ha visto que al neutralizar la infección por HCV con anticuerpos frente a Claudina-1, algunos aislados parecen escapar a dicha inhibición haciendo uso de la Claudina-6 como receptor alternativo (Haid y col., 2013). Las diferencias observadas en la susceptibilidad a la inhibición mediada por hidroxicina no es exclusiva de este fármaco ya que derivados de la 1,3,5-triacina, que inhibe la entrada viral de manera análoga a hidroxicina, bloquean selectivamente la entrada de los genotipos 1a y 1b pero no la de otros genotipos analizados (Baldick y col., 2010; Coburn y col., 2012) lo que podría sugerir, además de lo anteriormente mencionado, una acción directa para estos fármacos y la hidroxicina sobre las glicoproteínas de la envuelta viral.

Las glicoproteínas E1E2 son responsables de la fusión de las membranas plasmática y endosomal para la entrada del virión (Lavillette y col., 2006; Haid, Pietschmann, y Pecher 2009) y se caracterizan por presentar una enorme variabilidad genética entre genotipos (Simmonds 2004); variabilidad que podría ser la clave para entender las diferencias

observadas en la susceptibilidad a la inhibición mediada por hidroxicina. Esta variabilidad genética reside, mayoritariamente, en la región hipervariable I (HVR-I) de la proteína E2 y podría traducirse, por ejemplo, en diferencias en cuanto a la naturaleza de los residuos (aminoácidos) que la componen dependiendo del genotipo viral. De forma análoga al mecanismo de acción del arbidol, un inhibidor de la entrada de HCV (Teissier y col., 2011), hidroxicina podría unirse preferentemente a los residuos de la región HVR-I de unos genotipos virales pero no a los de otros, explicando las diferencias de susceptibilidad entre aislados. Cabe la posibilidad, asimismo, de que hidroxicina induzca cambios en el pH endosomal que alteren y/o dificulten el proceso de fusión dependiendo del genotipo viral. El pH óptimo al que tiene lugar la fusión promueve una serie de cambios conformacionales a nivel de la proteína E2 que implican a su región HVR-I (Lavillette y col., 2006). Es probable que, en función del genotipo viral, el pH al que tienen lugar dichos cambios varíe ligeramente. Todas estas circunstancias podrían explicar el comportamiento observado para el aislado utilizado como modelo del genotipo 5 de HCV (Figura R5) que muestra cierta resistencia a la inhibición mediada por los fármacos seleccionados. Es probable que ello responda a la especificidad genética del aislado concreto empleado en nuestro estudio. Para poder concluir al respecto de dicha resistencia sería necesario trabajar con un grupo más amplio de aislados del genotipo 5 de manera que la variabilidad genética que lo caracteriza quede bien representada. En conjunto, estos resultados ilustran la enorme complejidad que implica inhibir la entrada de HCV y refuerzan la idea de que profundizar en la búsqueda de

inhibidores de entrada es una buena estrategia para prevenir la infección por los diferentes genotipos virales.

Que la diana molecular de hidroxicina y benztropina sea un factor celular representaría una ventaja respecto a la mayoría de inhibidores actualmente disponibles que actúan sobre componentes estructurales del virus dado que ello retrasa la aparición de formas resistentes al fármaco, como se ha comprobado en el caso de la clorciclicina (He y col., 2015), e impide la aparición de mutantes de delección que reducen los efectos antivirales de la terapia con IFN para el tratamiento de la hepatitis crónica (Kohn y col., 2012).

Actualmente, los inhibidores de entrada no se emplean en clínica para el tratamiento de la infección crónica por HCV (Pawlotsky y col., 2015) lo que, en parte, se debe al hecho de que no está claro que la entrada viral sea necesaria para el mantenimiento de dicha infección ya que HCV puede diseminarse célula a célula a través de mecanismos alternativos a la entrada convencional del virión (Ramakrishnaiah y col., 2013; Brimacombe y col., 2011; Barretto y col., 2014). Dado el supuesto papel de hidroxicina sobre el receptor NPC1L1 y su participación en esta vía de entrada, es probable que dicho fármaco pudiera bloquear la diseminación célula a célula de HCV y reducir así la viremia. Ello ofrece un futuro prometedor para el tratamiento de pacientes infectados que esperan un trasplante hepático dado que limitaría la reinfección del órgano transplantado que, actualmente, tiene lugar casi en el 100% de los casos (Fofana y col., 2014). En el caso de la clorciclicina, se ha observado que su actividad antiviral presenta una elevada sinergia cuando se administra en

combinación con otros fármacos anti-HCV, como la ribavirina, IFN- α , telaprevir, boceprevir, sofosbuvir, daclatasvir o ciclosporina. A sin que aumente su citotoxicidad (He y col., 2015); de ser así también para hidroxicina, su uso combinado con ribavirina y sofosbuvir disminuiría considerablemente la recurrencia de relapso en los pacientes infectados que esperan un transplante (Curry y col., 2013). Recientemente, se ha demostrado que el uso combinado de un inhibidor de entrada, que actúa a nivel del receptor SR-BI, contribuye a erradicar la infección persistente por HCV en modelos animales de infección cuando se utiliza en combinación otros agentes antivirales directos (Vercauteren y col., 2015).

El hecho de que hidroxicina presente actividad como antihistamínico y antiemético le convierte en un buen complemento de las terapias a base de DAAs actualmente disponibles al reducir muchos de los efectos secundarios derivados de las mismas. En este sentido, recientemente, se ha recomendado su empleo en pacientes con HCV para aliviar algunos de los desórdenes dermatológicos derivados del tratamiento con telaprevir (Nguyen y Morgan 2012). Confiamos en que estudios retrospectivos sobre este grupo de pacientes contribuyan a determinar si hidroxicina influye positivamente en su tasa de curación tras someterse a estos tratamientos.

Aunque habría que considerar con precaución el traslado de nuestros resultados al contexto clínico, es importante destacar que no constan casos de toxicidad hepática como consecuencia del tratamiento con hidroxicina y benzotropina (Carranza y col., 2013; Simons y col., 1989; Simons, Simons, y Frith 1984). A pesar de que existen

limitaciones potenciales en relación a su empleo y que es necesario un estudio más profundo a este respecto, podemos considerar que ambos compuestos son antivirales potentes frente a la infección por HCV en cultivo celular y que constituyen una herramienta muy útil para estudiar aspectos básicos relacionados con la entrada de HCV, tal y como hemos demostrado en esta Tesis Doctoral.

D2.- Identificación de LPIN1 como diana celular frente a la infección por el virus de la hepatitis C

A fin de crear un microambiente favorable para el establecimiento de la infección, el virus de la hepatitis C interfiere con el metabolismo lipídico de la célula promoviendo la lipogénesis *de novo* y suprimiendo tanto la oxidación de ácidos grasos como su exporte desde el hepatocito para aumentar la disponibilidad de lípidos en la célula (Syed, Amako, y Siddiqui 2010). Siddiqui y colaboradores demostraron que la expresión de genes de HCV estimula la activación proteolítica de la proteína SREBP-1, implicada en lipogénesis *de novo*, y su translocación al núcleo para activar la expresión de genes implicados en la biosíntesis de colesterol y ácidos grasos (Waris y col., 2007; Vasallo y Gastaminza 2015). Uno de los genes regulados transcripcionalmente por SREBP-1 es LPIN1 por lo que es posible que HCV estimule la transcripción del mensajero de LPIN1 (Figura R8) vía SREBP-1, de manera análoga a lo que ocurre en la célula cuando la disponibilidad de esteroides es limitada (Ishimoto y col., 2009).

No obstante, esta inducción en los

niveles de mensajero de LPIN1 no informa de la localización subcelular de la proteína o del tipo de modificaciones post-traduccionales (fosforilación, sumoilación,...) que experimenta y que influyen en su actividad funcional. Desconocemos si la infección por HCV promueve su actividad PAP o su función como regulador transcripcional, aunque hemos observado que LPIN1 no modifica su localización subcelular como consecuencia de la infección (datos no mostrados). Analizar su actividad fosfatasa *per se* o medir la capacidad de LPIN1 para unirse a los receptores nucleares PPAR α o NFATc4 (Factor nuclear de linfocitos T activados, citoplásmico 4), entre otros, y regular la expresión génica durante la infección por HCV son objetivos futuros de este trabajo.

Hemos demostrado que los niveles intracelulares de LPIN1 son limitantes para el establecimiento de la replicación del genoma viral (Figuras R10B, R11 y R16A) sin que los procesos de entrada (Figura R15) y traducción primaria (Figura R16B) se vean afectados por ellos. La replicasa de HCV se ensambla en unas vesículas de doble membrana que aparecen como protrusiones de la membrana del RE en el citosol, aunque también presentan componentes derivados de las membranas de endosomas tardíos, mitocondria y LDs (Romero-Brey y col., 2012). Éstas se inducen en un proceso concertado entre las proteínas NS4B y NS5A, principalmente, y en el que también participan proteínas celulares como la quinasa de lípidos PI4K-III α y su sustrato, el PIP4 (Berger y col., 2011; Alvisi, Madan, y Bartenschlager 2011). La síntesis de fosfolípidos juega, por tanto, un papel relevante en la biogénesis de las DMVs y el establecimiento de los complejos de replicación de HCV. Conocido el papel de

LPIN1 en la síntesis de fosfolípidos y en la biogénesis de membranas celulares (Bou Khalil y col., 2010; Chuang y col., 2014), es posible que su deficiencia afecte al proceso de replicación viral por impedir la formación de DMVs, el ensamblaje de los complejos de replicación y/o interfiera con el funcionamiento de los mismos. Si bien LPIN1 es necesaria para la replicación de HCV, no lo es en el caso de otros virus cuyos complejos de replicación también se ensamblan en estructuras intracelulares membranosas, como el coronavirus humano 229E-GFP (Figura R13) (Romero-Brey y Bartenschlager 2014). Por tanto, LPIN1 tiene un papel específico sobre la replicación de HCV.

Para determinar si la ausencia de LPIN1 interfiere con la replicación del virus impidiendo la formación de las DMVs, podríamos sobre-expresar la poliproteína de HCV en células deficientes en LPIN1 de manera análoga a lo que se describe en (Romero-Brey y col., 2012). Si la ausencia de LPIN1 impide la formación de DMVs, entenderemos que LPIN1 interfiere con un aspecto estructural asociado a la replicación de HCV. Si, por el contrario, la sobre-expresión de la poliproteína del virus conduce al ensamblaje de las DMVs, consideraremos que LPIN1 interfiere con un aspecto funcional de la replicación viral.

En este sentido, el silenciamiento de la enzima diacilglicerol aciltransferasa (DGAT1), que actúa en un paso posterior a LPIN1 en la biosíntesis de TAG, no afecta a la replicación de HCV (Herker y col., 2010) lo que indica que una disminución en la disponibilidad de TAG por la célula, como el que podría tener lugar por el silenciamiento de LPIN1, no es limitante para la replicación del virus.

Dado que son muchas las especies de

lípidos cuya disponibilidad en la célula puede verse alterada a causa del silenciamiento de LPIN1, por acumulación de su sustrato (PA) y reducción de la presencia de su producto (DAG), el impacto que éste tiene sobre la replicación de HCV puede responder a la confluencia de varios factores. DAG y PE, a través de su interacción con el complejo PKD-Vps34 y ATG8/LC3, respectivamente, contribuyen a la maduración de autofagosomas (Dall'Armi, Devereaux, y Di Paolo 2013; Zhang, Verity, y Reue 2014). Una disminución en su abundancia relativa podría suprimir el proceso de autofagia, esencial en el establecimiento de la infección por HCV (Vasallo y Gastaminza 2015; Dreux y col., 2009). En condiciones normales, las membranas celulares que son ricas en PA, DAG y ceramidas adquieren una curvatura negativa que favorece los procesos de gemación y la fusión de vesículas necesarias para la formación de autofagosomas (Dall'Armi, Devereaux, y Di Paolo 2013). Los cambios en la abundancia relativa de PA y DAG que se producen con el silenciamiento de LPIN1 pueden afectar al tipo de curvatura que adoptan las membranas celulares impidiendo tanto la formación de autofagosomas (Dall'Armi, Devereaux, y Di Paolo 2013) como el ensamblaje de las DMVs en las que se establecen los complejos de replicación del virus. Además, el PA es un mediador de la cascada de señalización dependiente de mTORC1 (complejo 1 de mTOR), ya que contribuye a su activación (Yoon y col., 2011). mTORC1 regula los procesos de proliferación y supervivencia celular y modula la síntesis de lípidos vía SREBP-1 (Peterson y col., 2011). Es posible que, al silenciar LPIN1, los niveles intracelulares de PA aumenten y, con ello, la activación de mTORC1. En 2005, Baretta y

colaboradores propusieron que la activación de mTORC1 inhibe la replicación de HCV al promover la fosforilación de la proteína NS5A (Mannova y Beretta 2005). Por el contrario, recientemente se ha publicado que la activación de mTORC1 promueve la replicación de HCV, probablemente, al estimular la síntesis de lípidos vía SREBP-1 (Peterson y col., 2011) y bloquear la lipólisis de TAG en los LDs (Stohr y col., 2015). Aunque nuestros resultados están en concordancia con lo observado por Baretta y colaboradores, es complicado predecir el impacto de mTORC1 sobre la infección por HCV y, por consiguiente, el impacto de la posible acumulación intracelular de PA sobre la replicación viral. Experimentalmente, sería posible evaluar dicho impacto. En células normales, la adición exógena de PA o la sobre-expresión de la enzima diacilglicerol quinasa (que actúa en sentido opuesto a LPIN1 en la biosíntesis de triglicéridos) recapitulan el mismo fenómeno que se produce en la célula al silenciar LPIN1. Si en estas condiciones no se recupera la susceptibilidad a la infección por HCV, entenderemos que la acumulación intracelular de PA tiene un efecto negativo sobre la replicación del virus. De igual modo, añadiendo DAG exógenamente a células deficientes en LPIN1 y evaluando su susceptibilidad a la infección por HCV seríamos capaces de determinar si el efecto del silenciamiento de LPIN1 sobre la replicación de HCV está mediado por DAG.

Pero, además, hemos de considerar la posibilidad de que el silenciamiento de LPIN1 podría tener también un impacto sobre su actividad transcripcional y, por tanto, sobre la expresión de los genes que regula, algunos de los cuales podrían ser esenciales para el inicio de la replicación de HCV. Como hemos visto,

SREBP-1 es un gen positivamente regulado durante la infección por HCV (Waris y col., 2007). En condiciones normales, LPIN1 regula negativamente la expresión de SREBP-1 (Finck y col., 2006; Peterson y col., 2011) para el mantenimiento de la homeostasis lipídica celular (Ishimoto y col., 2009). En nuestros modelos experimentales, al silenciar LPIN1 cabría esperar un aumento en la expresión de SREBP-1 y de sus genes diana y, con ello, un aumento en la eficiencia de replicación de HCV; sin embargo, nuestros resultados indican lo contrario. Asimismo, el factor de transcripción PPAR α a través de su interacción directa con LPIN1 o, indirectamente, a través del complejo PGC-1 α -PPAR α promueve la expresión de genes implicados en la β -oxidación de ácidos grasos y en su exporte desde el hepatocito (Finck y col., 2006; Sugden, Caton, y Holness 2010; Mandard, Muller, y Kersten 2004). Ensayos *in vitro* demuestran que la inhibición farmacológica de PPAR α , a través de su antagonista, la 2-cloro-5-nitro-N-(piridil)-benzamida (BA), o mediante el empleo de siRNAs (RNAs pequeños de interferencia), inhibe la replicación de HCV (Rakic y col., 2006), lo que sugiere una función proviral para esta proteína. Nuestros resultados estarían en consonancia con estas observaciones ya que al silenciar LPIN1 podríamos estar reduciendo los niveles de expresión de PPAR α y, con ello, la eficiencia de transcripción del complejo PGC-1 α -PPAR α , inhibiendo, finalmente, la replicación de HCV.

En cualquier caso, para determinar la contribución relativa de las funciones PAP y transcripcional de LPIN1 a la infección por HCV sería interesante emplear versiones mutantes de LPIN1 que muestran un fenotipo dominante negativo, en células normales,

para su actividad enzimática (Donkor y col., 2009) o para su actividad PAP y transcripcional simultáneamente (Finck y col., 2006).

La actividad de LPIN1 como enzima PAP o coactivador transcripcional está regulada, entre otros aspectos, por su localización subcelular. En respuesta a diferentes estímulos, LPIN1 se transloca a la membrana del RE para desempeñar su función como enzima fosfatasa o al núcleo, para regular la expresión de sus genes diana (Bou Khalil y col., 2010). Datos preliminares obtenidos por microscopía confocal indican que, tanto en células normales como en células infectadas, LPIN1 aparece mayoritariamente en el citosol e indican que LPIN1 colocaliza con proteínas tanto estructurales (core, E2) como no estructurales (NS3, NS5A) del virus y que aparece en zonas de contacto con LDs en las que colocaliza parcialmente con la proteína core (datos no mostrados).

Como ya comentamos, existen dos isoformas mayoritarias de LPIN1 en hígado, LPIN1 α y LPIN1 β . Cada isoforma presenta una localización subcelular preferente que, al menos, en adipocitos se asocia con una función distinta. LPIN1 α aparece en núcleo y citoplasma mientras que LPIN1 β sólo se encuentra en citoplasma promoviendo, además, la lipogénesis *de novo* (Peterfy, Phan, y Reue 2005; Reue y col., 2000). Ensayos de RT-PCR semicuantitativa en RNA total de células Huh-7 (datos no mostrados) indican que la isoforma 1 β es la que se expresa mayoritariamente en esta línea celular, tal y como se ha descrito en hígado humano y de ratón (Peterfy, Phan, y Reue 2005; Croce y col., 2007; Csaki y col., 2013), y que, como en adipocitos, LPIN1 β muestra una localización exclusivamente citoplásmica (Peterfy, Phan, y

Reue 2005). Para determinar la relevancia relativa de cada una de estas isoformas en el contexto de la infección, se tratará de recuperar la susceptibilidad a la infección por HCV mediante la sobre-expresión de los cDNAs correspondientes a las isoformas α y β de LPIN1.

En el contexto de una infección persistente, sin embargo, LPIN1 no es limitante para la replicación del genoma de HCV o la producción de progenie infecciosa (Figura R14) de manera análoga a lo observado en el caso del receptor SIGMA-1 (S1R), una chaperona residente en el RE (Friesland y col., 2013). Tanto LPIN1 como S1R son limitantes para la iniciación de la infección, pero no una vez que la maquinaria de replicación se ha establecido. De hecho, datos preliminares del laboratorio sugieren que S1R estaría actuando en un paso posterior a la traducción primaria previo al establecimiento de la replicación del RNA viral, aunque no queda claro que LPIN1 actúe al mismo nivel. Esta hipótesis es similar a la que se postula para los genes asociados al proceso de autofagia, *atg4b*, *atg5*, *atg12* (codifican las proteínas ATG4B, ATG5 y ATG12, respectivamente) o *becn1* (codifica la proteína BECLIN-1), cuya expresión resulta limitante para la traducción de genomas entrantes (o traducción primaria) pero no para la traducción de los genomas virales generados tras el proceso de replicación (Dreux y col., 2009). En conjunto, estos resultados sugieren que los genes celulares cuya expresión es necesaria para el establecimiento de la infección difieren de aquellos que el virus requiere para el mantenimiento de la misma. Todos los procesos que tienen lugar en la célula hospedadora hasta el establecimiento de la infección se desarrollan en un ambiente

caracterizado por un nivel de expresión reducido para las proteínas virales. En tales condiciones, es asumible que la expresión de los genes celulares implicados en la formación de los complejos de replicación resulte limitante, pero no una vez que la maquinaria viral se ha hecho con el control del metabolismo celular para crear el ambiente más adecuado para su replicación. Alternativamente, es posible que el grado de silenciamiento logrado para LPIN1 con el conjunto de silenciadores empleado no sea suficiente para revelar el papel que LPIN1 tiene en la infección persistente.

Aunque los niveles intracelulares de LPIN1 no son limitantes para la producción de progenie infecciosa, las células LPIN1low muestran una reducción, aunque no estadísticamente significativa, en la tasa de ensamblaje de partículas virales con respecto a las células control (datos no mostrados), lo que podría estar en relación con la capacidad de LPIN1 para regular el metabolismo de VLDL (Bou Khalil y col., 2009). Gastaminza y colaboradores y otros autores mostraron que la producción de viriones de HCV correlaciona con la secreción de apoB al medio extracelular (Gastaminza y col., 2008; Huang y col., 2007). Sin embargo, recientemente se ha visto que, tras el ensamblaje de la partícula viral, las vías de secreción de apolipoproteínas y viriones divergen en algún punto de la ruta exocítica (Benedicto y col., 2015). De ser así, estos resultados explicarían nuestras observaciones. Si LPIN1 está bloqueando algún paso en el ensamblaje y/o secreción de VLDL y esta vía diverge, en algún punto, de la empleada por el virión, el silenciamiento de LPIN1 podría tener un impacto menor sobre la producción de progenie infecciosa que sobre la producción de VLDL. No obstante, podría ser que algunos

viriones escapasen a su vía de secreción normal y saliesen de la célula junto con las VLDL (Bartenschlager y col., 2011); ello explicaría la pequeña reducción en la tasa de ensamblaje que hemos comentado para las células LPIN1low.

Existen mecanismos compensatorios para la expresión de LPIN1 y LPIN2 que permiten el mantenimiento de la homeostasis lipídica celular (Dwyer J.R. 2012; Gropler y col., 2009). En el hígado, esta regulación homeostática afecta, principalmente, a la función PAP de ambas lipinas y tiene lugar a través de un mecanismo post-transcripcional que permite cambios rápidos en la disponibilidad de la proteína para la síntesis de lípidos, sin que los niveles de mensajero de LPIN1 y LPIN2 se modifiquen (Dwyer J.R. 2012). Frente a lo que cabría esperar, observamos que, en paralelo a la inducción comentada para los niveles de mensajero de LPIN1 durante la infección (Figura R8), el número de copias de mensajero de LPIN2 también aumenta a medida que HCV replica su genoma (datos no mostrados). Aunque LPIN2 tarda más en inducirse que LPIN1 a lo largo de la infección, LPIN2 experimenta una inducción promedio de 1.3 veces en sus niveles de mensajero con respecto a la situación control (datos no mostrados). El establecimiento de la infección por HCV requiere de una elevada disponibilidad de lípidos en la célula con los que ensamblar nuevas membranas, formar los complejos de replicación o aumentar la producción de LDs (Popescu y col., 2014; Syed, Amako, y Siddiqui 2010). Es probable que, para satisfacer esta demanda, la capacidad de LPIN1 para inducir la síntesis de TAG y fosfolípidos no sea suficiente porque, por ejemplo, el virus no sólo requiera más lípidos sino también más

rápidamente. En conjunto, ello explicaría no sólo la inducción de LPIN2 sino que, además, ésta tenga lugar un poco más tarde que la de LPIN1 y a nivel de mensajero y no únicamente de proteína.

Los resultados del trabajo realizado en el laboratorio por Victoria Castro junto con los resultados mostrados en esta Tesis Doctoral indican que las lipinas LPIN1 y LPIN2 juegan un papel importante en la infección por HCV. Aunque ambas proteínas parecen tener un papel relevante sobre la replicación de HCV (Trabajo Fin de Máster de Victoria Castro), los estudios realizados por Victoria Castro indican que, además, LPIN2 podría estar implicada en la entrada del virus a la célula hospedadora, aspecto para el que LPIN1 no parece ser limitante. Dado que la actividad PAP en el hígado se debe mayoritariamente a LPIN2, su silenciamiento tendrá un impacto mucho mayor sobre la disponibilidad de TAG, DAG, PA y fosfolípidos de membranas (PC y PE) que el que se produce cuando LPIN1 es limitante (Gropler y col., 2009). Cambios en la composición lipídica de las membranas celulares conllevan ciertos cambios en sus propiedades fisicoquímicas que pueden afectar a su dinámica y funcionamiento impidiendo, por ejemplo, la endocitosis del virión mediada por clatrina. Un aumento en la disponibilidad celular de PA puede alterar la síntesis de fosfolípidos que, como el fosfatidil inositol 4-5 bifosfato (PI-4,5-P₂), son esenciales para el ensamblaje de clatrina a la membrana plasmática (Posor, Eichhorn-Grunig, y Haucke 2015). Además, la abundancia relativa, accesibilidad y actividad de ciertos receptores que son imprescindibles para la entrada de HCV (Burlone y Budkowska 2009; Douam, Lavillette, y Cosset 2015; Popescu y col., 2014) también puede verse

afectada. La disponibilidad de lípidos regula tanto la expresión de algunos receptores, como es el caso de CD81 (Kapadia y col., 2007; Voisset y col., 2008), como la síntesis de las lipoproteínas asociadas al virión (Bou Khalil y col., 2009) y se sabe que algunos de los receptores de HCV están implicados en la internalización de lipoproteínas (Ploss y Evans 2012). Dado que la entrada de HCV en el hepatocito es un proceso complejo que, en muchos de sus pasos depende del metabolismo lipídico celular (Popescu y col., 2014), parece probable que las alteraciones en la homeostasis normal de lípidos en el hígado inducidas por el silenciamiento de LPIN2 puedan estar afectando a algunos de estos pasos. En conjunto, estos resultados sugieren que LPIN1 y LPIN2 tienen, además de funciones solapantes, funciones únicas.

Aunque la función como coactivador transcripcional *in vivo* sólo está definida para LPIN1 (Finck y col., 2006), se sabe que dicha actividad es similar para ambas lipinas (Donkor y col., 2009). No obstante, cabe especular que LPIN2 tenga genes diana diferentes a los de LPIN1 y, por ello, pueda regular aspectos distintos de la infección por HCV. Dada la relación funcional y de regulación existente entre LPIN1 y LPIN2 y la aparente implicación de cada una de ellas, por separado, en la infección por HCV, sería interesante analizar si los mecanismos compensatorios que existen entre ambas proteínas en células normales también operan en el contexto de la infección por HCV. Aunque el silenciamiento simultáneo de LPIN1 y LPIN2 provoca letalidad embrionaria en ratón (Dwyer J.R. 2012), sería importante determinar su impacto en la infección; es posible, aunque no lo hayamos estudiado, que la infección por HCV también induzca la

expresión de LPIN3 y que ésta compense la deficiencia conjunta de LPIN1 y LPIN2 (Donkor y col., 2007).

El desbalance que provoca la infección por HCV en la homeostasis lipídica de la célula conduce, en muchos casos, al desarrollo de hepatoesteatosis (Syed, Amako, y Siddiqui 2010). En pacientes infectados con el genotipo 3 de HCV se ha observado que la aparición de esteatosis es una consecuencia directa de la expresión de la proteína core (Jackel-Cram, Babiuk, y Liu 2007; Negro 2006; Negro y Sanyal 2009; Syed, Amako, y Siddiqui 2010) que, entre otros procesos, promueve la activación persistente de SREBP-1 (Moriishi y Matsuura 2012). Teniendo en cuenta que SREBP-1 activa la expresión de LPIN1 y los resultados mostrados al inicio de esta discusión, sería interesante evaluar los niveles de expresión de LPIN1 en muestras de tejido de pacientes infectados tanto con el genotipo 3 como con otros genotipos virales, y comprobar si existe una correlación entre los mismos y el desarrollo de esteatosis. Aunque la aparición de esteatosis responde a un proceso complejo en el que intervienen múltiples factores celulares (PPAR α , DGAT1,...) (Negro y Sanyal 2009; Moriishi y Matsuura 2012; Bartenschlager y col., 2011), el hecho de que su desarrollo correlacione con los niveles de expresión de LPIN1 en la célula refuerza la hipótesis de que actuando sobre esta proteína seremos capaces de controlar, al menos en parte, la patogénesis asociada a la infección por HCV.

En conjunto, los resultados mostrados en esta Tesis Doctoral sugieren que modulando las diferentes actividades de LPIN1 podríamos no sólo inhibir la infección por HCV sino también algunas de las alteraciones

metabólicas que se inducen como consecuencia de la infección.

LPIN1 se presenta así como diana celular para el diseño de fármacos que inhiban la infección por HCV y que puedan complementar a las nuevas terapias anti-HCV, particularmente respecto a la prevención de resistencias virales o su eficacia frente a un mayor número de genotipos, pero siempre teniendo en cuenta los posibles efectos adversos que podrían derivarse de interferir con las funciones endógenas de LPIN1 en tejidos y órgano.

10. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral se extraen las siguientes conclusiones:

1. Mediante rastreo con un sistema de infección no sesgado y miniaturizado que reproduce el ciclo replicativo completo del virus de la hepatitis C se han identificado fármacos de uso clínico con actividad antiviral frente al mismo a concentraciones subtóxicas y alcanzables, en el caso de hidroxicina, en pacientes humanos.
2. Hidroxicina y Benztropina bloquean la entrada de diferentes genotipos del virus de la hepatitis C de forma selectiva en un paso posterior a su adsorción a la célula hospedadora, probablemente interfiriendo con aspectos relacionados con las funciones de las proteínas de la envuelta viral E1E2.
3. La infección por el virus de la hepatitis C induce la expresión de LPIN1 a nivel de RNA mensajero y de proteína. Aunque se desconoce el impacto real de dicha alteración, ésta podría contribuir a aspectos de la patogénesis viral relacionados con cambios en el metabolismo de lípidos.
4. Empleando sistemas de silenciamiento basados en RNAi, hemos demostrado que la proteína celular LPIN1 es un factor limitante en estadios tempranos de la infección por el virus de la hepatitis C que dan lugar a acumulación de RNA viral .
5. La expresión de LPIN1 no es limitante en la infección persistente por el virus de la hepatitis C, lo que sugiere un papel restringido a la colonización inicial de la célula diana.
6. La expresión de LPIN1 no es limitante para la infección por el coronavirus humano 229E-GFP, lo que sugiere que LPIN1 es particularmente relevante en la infección por el virus de la hepatitis C.
7. LPIN1 y otros miembros de la familia de las lipinas constituyen dianas celulares potenciales frente al virus de la hepatitis C. Su contribución relativa y funciones en el ciclo vital del virus de la hepatitis C deberán ser evaluadas con detalle para comprender su papel en la infección y para el desarrollo de sistemas de rastreo de fármacos anti-HCV adecuados.

11. BIBLIOGRAFÍA

A

- Abid, K., V. Pazienza, A. de Gottardi, L. Rubbia-Brandt, B. Conne, P. Pugnale, C. Rossi, A. Mangia, F. Negro.** 2005. 'An in vitro model of hepatitis C virus genotype 3a-associated triglycerides accumulation', *J Hepatol*, **42**: 744-51.
- Adinolfi, L. E., L. Restivo, A. Marrone.** 2013. 'The predictive value of steatosis in hepatitis C virus infection', *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, **7**: 205-13.
- Agnello, V., G. Abel, M. Elfahal, G. B. Knight, Q. X. Zhang.** 1999. 'Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor', *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**: 12766-71.
- Agundez, J. A., E. Garcia-Martin, H. Alonso-Navarro, F. J. Jimenez-Jimenez.** 2013. 'Anti-Parkinson's disease drugs and pharmacogenetic considerations', *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, **9**: 859-74.
- Aizaki, H., K. J. Lee, V. M. Sung, H. Ishiko, M. M. Lai.** 2004. 'Characterization of the hepatitis C virus RNA replication complex associated with lipid rafts', *Virology*, **324**: 450-61.
- Albecka, A., S. Belouzard, A. Op de Beeck, V. Descamps, L. Goueslain, J. Bertrand-Michel, F. Terce, G. Duverlie, Y. Rouille, J. Dubuisson.** 2012. 'Role of low-density lipoprotein receptor in the hepatitis C virus life cycle', *Hepatology*, **55**: 998-1007.
- Alter, H.** 1999. 'Discovery of non-A, non-B hepatitis and identification of its etiology', *Am J Med*, **107**: 16S-20S.
- Alvisi, G., V. Madan, R. Bartenschlager.** 2011. 'Hepatitis C virus and host cell lipids: an intimate connection', *RNA Biol*, **8**: 258-69.
- Andre, P., F. Komurian-Pradel, S. Deforges, M. Perret, J. L. Berland, M. Sodoyer, S. Pol, C. Brechot, G. Paranhos-Baccala, V. Lotteau.** 2002. 'Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles', *J Virol*, **76**: 6919-28.
- Appel, N., T. Pietschmann, R. Bartenschlager.** 2005. 'Mutational analysis of hepatitis C virus nonstructural protein 5A: potential role of differential phosphorylation in RNA replication and identification of a genetically flexible domain', *J Virol*, **79**: 3187-94.
- Appel, N., M. Zayas, S. Miller, J. Krijnse-Locker, T. Schaller, P. Friebe, S. Kallis, U. Engel, R. Bartenschlager.** 2008. 'Essential role of domain III of nonstructural protein 5A for hepatitis C virus infectious particle assembly', *PLoS Pathog*, **4**: e1000035.

B

Backes, P., D. Quinkert, S. Reiss, M. Binder, M. Zayas, U. Rescher, V. Gerke, R. Bartenschlager, V. Lohmann. 2010. 'Role of annexin A2 in the production of infectious hepatitis C virus particles', *J Virol*, **84**: 5775-89.

Baldick, C. J., M. J. Wichroski, A. Pendri, A. W. Walsh, J. Fang, C. E. Mazzucco, K. A. Pokornowski, R. E. Rose, B. J. Eggers, M. Hsu, W. Zhai, G. Zhai, S. W. Gerritz, M. A. Poss, N. A. Meanwell, M. I. Cockett, D. J. Tenney. 2010. 'A novel small molecule inhibitor of hepatitis C virus entry', *PLoS Pathog*, **6**: e1001086.

Bankwitz, D., E. Steinmann, J. Bitzegeio, S. Ciesek, M. Friesland, E. Herrmann, M. B. Zeisel, T. F. Baumert, Z. Y. Keck, S. K. Fong, E. I. Pecheur, T. Pietschmann. 2010. 'Hepatitis C virus hypervariable region 1 modulates receptor interactions, conceals the CD81 binding site, and protects conserved neutralizing epitopes', *J Virol*, **84**: 5751-63.

Barba, G., F. Harper, T. Harada, M. Kohara, S. Goulinet, Y. Matsuura, G. Eder, Z. Schaff, M. J. Chapman, T. Miyamura, C. Brechot. 1997. 'Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets', *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**: 1200-5.

Barker, L. F., F. V. Chisari, P. P. McGrath, D. W. Dalgard, R. L. Kirschstein, J. D. Almeida, T. S. Edington, D. G. Sharp, M. R. Peterson. 1973. 'Transmission of type B viral hepatitis to chimpanzees', *J Infect Dis*, **127**: 648-62.

Barretto, Naina, Bruno Sainz, Snawar Hussein, Susan L Uprichard. 2014. "Determining the involvement of host cellular factors in HCV cell-to-cell spread and the therapeutic implications.", *J Virol*, **88**: 5050-61.

Bartenschlager, R., M. Frese, T. Pietschmann. 2004. 'Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence', *Adv Virus Res*, **63**: 71-180.

Bartenschlager, R., V. Lohmann, F. Penin. 2013. 'The molecular and structural basis of advanced antiviral therapy for hepatitis C virus infection', *Nat Rev Microbiol*, **11**: 482-96.

Bartenschlager, R., F. Penin, V. Lohmann, P. Andre. 2011. 'Assembly of infectious hepatitis C virus particles', *Trends Microbiol*, **19**: 95-103.

Bartosch, B., F. L. Cosset. 2006. 'Cell entry of hepatitis C virus', *Virology*, **348**: 1-12.

Bartosch, B., J. Dubuisson. 2010. 'Recent advances in hepatitis C virus cell entry', *Viruses*, **2**: 692-709.

- Bartosch, B., J. Dubuisson, F. L. Cosset.** 2003. 'Infectious Hepatitis C Virus Pseudo-particles Containing Functional E1-E2 Envelope Protein Complexes', *Journal of Experimental Medicine*, **197**: 633-42.
- Baumert, J. Z. Rappoport, P. Balfe, J. A. McKeating.** 2012. 'Hepatitis C virus induces CD81 and claudin-1 endocytosis', *J Virol*, **86**: 4305-16.
- Behrens, S. E., L. Tomei, R. De Francesco.** 1996. 'Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus', *EMBO J*, **15**: 12-22.
- Benedicto, I., V. Gondar, F. Molina-Jimenez, L. Garcia-Buey, M. Lopez-Cabrera, P. Gastaminza, P. L. Majano.** 2015. 'Clathrin mediates infectious hepatitis C virus particle egress', *J Virol*, **89**: 4180-90.
- Berger, C., I. Romero-Brey, D. Radujkovic, R. Terreux, M. Zayas, D. Paul, C. Harak, S. Hoppe, M. Gao, F. Penin, V. Lohmann, R. Bartenschlager.** 2014. 'Daclatasvir-like inhibitors of NS5A block early biogenesis of hepatitis C virus-induced membranous replication factories, independent of RNA replication', *Gastroenterology*, **147**: 1094-105 e25.
- Berger, K. L., S. M. Kelly, T. X. Jordan, M. A. Tartell, G. Randall.** 2011. 'Hepatitis C virus stimulates the phosphatidylinositol 4-kinase III alpha-dependent phosphatidylinositol 4-phosphate production that is essential for its replication', *J Virol*, **85**: 8870-83.
- Bernhardt, G., H. Reile, H. Birnbock, T. Spruss, H. Schonenberger.** 1992. 'Standardized kinetic microassay to quantify differential chemosensitivity on the basis of proliferative activity', *J Cancer Res Clin Oncol*, **118**: 35-43.
- Bianco, A., V. Reghellin, L. Donnici, S. Fenu, R. Alvarez, C. Baruffa, F. Peri, M. Pagani, S. Abrignani, P. Neddermann, R. De Francesco.** 2012. 'Metabolism of phosphatidylinositol 4-kinase IIIalpha-dependent PI4P is subverted by HCV and is targeted by a 4-anilino quinazoline with antiviral activity', *PLoS Pathog*, **8**: e1002576.
- Bigger, C. B., B. Guerra, K. M. Brasky, G. Hubbard, M. R. Beard, B. A. Luxon, S. M. Lemon, R. E. Lanford.** 2004. 'Intrahepatic gene expression during chronic hepatitis C virus infection in chimpanzees', *J Virol*, **78**: 13779-92.
- Blackham, S., A. Baillie, F. Al-Hababi, K. Remlinger, S. You, R. Hamatake, M. J. McGarvey.** 2010. 'Gene expression profiling indicates the roles of host oxidative stress, apoptosis, lipid metabolism, and intracellular transport genes in the replication of hepatitis C virus', *J Virol*, **84**: 5404-14.
- Blanchard, E., S. Belouzard, L. Goueslain, T. Wakita, J. Dubuisson, C. Wychowski, Y. Rouille.** 2006. 'Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis', *J Virol*, **80**: 6964-72.

Blight, K. J., J. A. McKeating, C. M. Rice. 2002. 'Highly Permissive Cell Lines for Subgenomic and Genomic Hepatitis C Virus RNA Replication', *Journal of Virology*, **76**: 13001-14.

Boson, B., O. Granio, R. Bartenschlager, F. L. Cosset. 2011. 'A concerted action of hepatitis C virus p7 and nonstructural protein 2 regulates core localization at the endoplasmic reticulum and virus assembly', *PLoS Pathog*, **7**: e1002144.

Bou Khalil, M., A. Blais, D. Figeys, Z. Yao. 2010. 'Lipin - The bridge between hepatic glycerolipid biosynthesis and lipoprotein metabolism', *Biochim Biophys Acta*, **1801**: 1249-59.

Bou Khalil, M., M. Sundaram, H. Y. Zhang, P. H. Links, J. F. Raven, B. Manmontri, M. Sariahmetoglu, K. Tran, K. Reue, D. N. Brindley, Z. Yao. 2009. 'The level and compartmentalization of phosphatidate phosphatase-1 (lipin-1) control the assembly and secretion of hepatic VLDL', *J Lipid Res*, **50**: 47-58.

Boulant, S., R. Montserret, R. G. Hope, M. Ratnier, P. Targett-Adams, J. P. Laverne, F. Penin, J. McLauchlan. 2006. 'Structural determinants that target the hepatitis C virus core protein to lipid droplets', *J Biol Chem*, **281**: 22236-47.

Boulant, S., C. Vanbelle, C. Ebel, F. Penin, J. P. Laverne. 2005. 'Hepatitis C virus core protein is a dimeric alpha-helical protein exhibiting membrane protein features', *J Virol*, **79**: 11353-65.

Boulestin, A., K. Sandres-Saune, J. L. Payen, L. Alric, M. Dubois, C. Pasquier, J. P. Vinel, J. P. Pascal, J. Puel, J. Izopet. 2002. 'Genetic heterogeneity of the envelope 2 gene and eradication of hepatitis C virus after a second course of interferon-alpha', *J Med Virol*, **68**: 221-8.

Boyer, A., A. Dumans, E. Beaumont, L. Etienne, P. Roingeard, J. C. Meunier. 2014. 'The association of hepatitis C virus glycoproteins with apolipoproteins E and B early in assembly is conserved in lipoviral particles', *J Biol Chem*, **289**: 18904-13.

Bradshaw, D., G. Matthews, M. Danta. 2013. 'Sexually transmitted hepatitis C infection: the new epidemic in MSM?', *Curr Opin Infect Dis*, **26**: 66-72.

Branch, A. D., D. D. Stump, J. A. Gutierrez, F. Eng, J. L. Walewski. 2005. 'The hepatitis C virus alternate reading frame (ARF) and its family of novel products: the alternate reading frame protein/F-protein, the double-frameshift protein, and others', *Semin Liver Dis*, **25**: 105-17.

Brimacombe, C. L., J. Grove, L. W. Meredith, K. Hu, A. J. Syder, M. V. Flores, J. M. Timpe, S. E. Krieger, T. F. Baumert, T. L. Tellinghuisen, F. Wong-Staal, P. Balfe, J. A. McKeating. 2011. 'Neutralizing antibody-resistant hepatitis C virus cell-to-cell transmission', *J Virol*, **85**: 596-605.

Burlone, M. E., A. Budkowska. 2009. 'Hepatitis C virus cell entry: role of lipoproteins and cellular receptors', *J Gen Virol*, **90**: 1055-70.

C

Camus, G., E. Herker, A. A. Modi, J. T. Haas, H. R. Ramage, R. V. Farese, Jr., M. Ott. 2013. 'Diacylglycerol acyltransferase-1 localizes hepatitis C virus NS5A protein to lipid droplets and enhances NS5A interaction with the viral capsid core', *J Biol Chem*, **288**: 9915-23.

Carranza, M., M.R. Snyder, J.D. Shaw, T.A. Zesiewicz. 2013. *Parkinson's Disease* (Seed Medical Publishers).

Carroll, S. S., J. E. Tomassini, M. Bosserman, K. Getty, M. W. Stahlhut, A. B. Eldrup, B. Bhat, D. Hall, A. L. Simcoe, R. LaFemina, C. A. Rutkowski, B. Wolanski, Z. Yang, G. Migliaccio, R. De Francesco, L. C. Kuo, M. MacCoss, D. B. Olsen. 2003. 'Inhibition of hepatitis C virus RNA replication by 2'-modified nucleoside analogs', *J Biol Chem*, **278**: 11979-84.

Catanese, M. T., K. Uryu, M. Kopp, T. J. Edwards, L. Andrus, W. J. Rice, M. Silvestry, R. J. Kuhn, C. M. Rice. 2013. 'Ultrastructural analysis of hepatitis C virus particles', *Proc Natl Acad Sci U S A*, **110**: 9505-10.

Chamoun-Emanuelli, A. M., E. I. Pecheur, Z. Chen. 2014. 'Benzhydrylpiperazine compounds inhibit cholesterol-dependent cellular entry of hepatitis C virus', *Antiviral Res*, **109**: 141-8.

Chamoun-Emanuelli, A. M., E. I. Pecheur, R. L. Simeon, D. Huang, P. S. Cremer, Z. Chen. 2013. 'Phenothiazines inhibit hepatitis C virus entry, likely by increasing the fluidity of cholesterol-rich membranes', *Antimicrob Agents Chemother*, **57**: 2571-81.

Chao, T. C., W. C. Su, J. Y. Huang, Y. C. Chen, K. S. Jeng, H. D. Wang, M. M. Lai. 2012. 'Proline-serine-threonine phosphatase-interacting protein 2 (PSTPIP2), a host membrane-deforming protein, is critical for membranous web formation in hepatitis C virus replication', *J Virol*, **86**: 1739-49.

Chomczynski, P., N. Sacchi. 1987. 'Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction', *Anal Biochem*, **162**: 156-9.

Choo, Q. L., G. Kuo, A. J. Weiner, L. R. Overby, D. W. Bradley, M. Houghton. 1989. 'Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome', *Science*, **244**: 359-62.

Chuang, C., D. Barajas, J. Qin, P. D. Nagy. 2014. 'Inactivation of the host lipin gene accelerates RNA virus replication through viral exploitation of the expanded endoplasmic reticulum membrane', *PLoS Pathog*, **10**: e1003944.

- Clarke, D., S. Griffin, L. Beales, C. S. Gelais, S. Burgess, M. Harris, D. Rowlands. 2006. 'Evidence for the formation of a heptameric ion channel complex by the hepatitis C virus p7 protein in vitro', *J Biol Chem*, **281**: 37057-68.
- Coburn, G. A., D. N. Fisch, S. M. Moorji, J. M. de Muys, J. D. Murga, D. Paul, K. P. Provoncha, Y. Rotshteyn, A. Q. Han, D. Qian, P. J. Maddon, W. C. Olson. 2012. 'Novel small-molecule inhibitors of hepatitis C virus entry block viral spread and promote viral clearance in cell culture', *PLoS One*, **7**: e35351.
- Coller, K. E., K. L. Berger, N. S. Heaton, J. D. Cooper, R. Yoon, G. Randall. 2009. 'RNA interference and single particle tracking analysis of hepatitis C virus endocytosis', *PLoS Pathog*, **5**: e1000702.
- Coller, K. E., N. S. Heaton, K. L. Berger, J. D. Cooper, J. L. Saunders, G. Randall. 2012. 'Molecular determinants and dynamics of hepatitis C virus secretion', *PLoS Pathog*, **8**: e1002466.
- Conry-Cantilena, C., M. VanRaden, J. Gible, J. Melpolder, A. O. Shakil, L. Viladomiu, L. Cheung, A. DiBisceglie, J. Hoofnagle, J. W. Shih, et al. 1996. 'Routes of infection, viremia, and liver disease in blood donors found to have hepatitis C virus infection', *N Engl J Med*, **334**: 1691-6.
- Counihan, N. A., S. M. Rawlinson, B. D. Lindenbach. 2011. 'Trafficking of hepatitis C virus core protein during virus particle assembly', *PLoS Pathog*, **7**: e1002302.
- Croce, M. A., J. C. Eagon, L. L. LaRiviere, K. M. Korenblat, S. Klein, B. N. Finck. 2007. 'Hepatic lipin 1beta expression is diminished in insulin-resistant obese subjects and is reactivated by marked weight loss', *Diabetes*, **56**: 2395-9.
- Csaki, L. S., J. R. Dwyer, L. G. Fong, P. Tontonoz, S. G. Young, K. Reue. 2013. 'Lipins, lipinopathies, and the modulation of cellular lipid storage and signaling', *Prog Lipid Res*, **52**: 305-16.
- Csaki, L. S., K. Reue. 2010. 'Lipins: multifunctional lipid metabolism proteins', *Annu Rev Nutr*, **30**: 257-72.
- Curry, M.P., X. Forns, R.T. Chung, N. Terrault, R. S. Brown, Fenkel. J.M., F.D. Gordon, J.G. O'Leary, A. Kuo, T.D. Schiano, G.T. Everson, E. R. Schiff, A. Befeler, J. G. McHutchison, W.T. Symonds, J.M. Denning, L. McNair, S. Arterburn, D. Moonka, E.J. Gane, N. H. Afdhal. 2013. 'Pretransplant Sofosbuvir and Ribavirin to Prevent Recurrence of HCV Infection after Liver Transplantation', *Hepatology*, **58**: 314A. doi: 10.1002/hep.26727

D

- Dall'Armi, C., K. A. Devereaux, G. Di Paolo.** 2013. 'The role of lipids in the control of autophagy', *Curr Biol*, **23**: R33-45.
- Dao Thi, V. L., C. Granier, M. B. Zeisel, M. Guerin, J. Mancip, O. Granio, F. Penin, D. Lavillette, R. Bartenschlager, T. F. Baumert, F. L. Cosset, M. Dreux.** 2012. 'Characterization of hepatitis C virus particle subpopulations reveals multiple usage of the scavenger receptor BI for entry steps', *J Biol Chem*, **287**: 31242-57.
- de Gottardi, A., V. Pazienza, P. Pugnale, F. Bruttin, L. Rubbia-Brandt, C. E. Juge-Aubry, C. A. Meier, A. Hadengue, F. Negro.** 2006. 'Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and -gamma mRNA levels are reduced in chronic hepatitis C with steatosis and genotype 3 infection', *Aliment Pharmacol Ther*, **23**: 107-14.
- de la Fuente, C., Z. Goodman, C. M. Rice.** 2013. 'Genetic and functional characterization of the N-terminal region of the hepatitis C virus NS2 protein', *J Virol*, **87**: 4130-45.
- Diamond, D. L., A. J. Syder, J. M. Jacobs, C. M. Sorensen, K. A. Walters, S. C. Proll, J. E. McDermott, M. A. Gritsenko, Q. Zhang, R. Zhao, T. O. Metz, D. G. Camp, 2nd, K. M. Waters, R. D. Smith, C. M. Rice, M. G. Katze.** 2010. 'Temporal proteome and lipidome profiles reveal hepatitis C virus-associated reprogramming of hepatocellular metabolism and bioenergetics', *PLoS Pathog*, **6**: e1000719.
- Ding, Q., M. von Schaewen, A. Ploss.** 2014. 'The impact of hepatitis C virus entry on viral tropism', *Cell Host Microbe*, **16**: 562-8.
- Domingo, E., J. Sheldon, C. Perales.** 2012. 'Viral quasispecies evolution', *Microbiol Mol Biol Rev*, **76**: 159-216.
- Donkor, J., M. Sariahmetoglu, J. Dewald, D. N. Brindley, K. Reue.** 2007. 'Three mammalian lipins act as phosphatidate phosphatases with distinct tissue expression patterns', *J Biol Chem*, **282**: 3450-7.
- Donkor, J., P. Zhang, S. Wong, L. O'Loughlin, J. Dewald, B. P. Kok, D. N. Brindley, K. Reue.** 2009. 'A conserved serine residue is required for the phosphatidate phosphatase activity but not the transcriptional coactivator functions of lipin-1 and lipin-2', *J Biol Chem*, **284**: 29968-78.
- Douam, F., D. Lavillette, F. L. Cosset.** 2015. 'The mechanism of HCV entry into host cells', *Prog Mol Biol Transl Sci*, **129**: 63-107.

Dreux, M., P. Gastaminza, S. F. Wieland, F. V. Chisari. 2009. 'The autophagy machinery is required to initiate hepatitis C virus replication', *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**: 14046-51.

Dubuisson, J. 2007. 'Hepatitis C virus proteins', *World J Gastroenterol*, **13**: 2406-15.

Dubuisson, J., F. Penin, D. Moradpour. 2002. 'Interaction of hepatitis C virus proteins with host cell membranes and lipids', *Trends Cell Biol*, **12**: 517-23.

Dull, T., R. Zufferey, M. Kelly, R. J. Mandel, M. Nguyen, D. Trono, L. Naldini. 1998. 'A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system', *J Virol*, **72**: 8463-71.

Dwyer J.R., Donkor J., Zhang P., Csaki L.S., Vergnes L., Lee J.M., Dewald J., Brindley D.N., Atti E., Tetradis S., Yoshinaga Y., De Jong P.J., Fong L.G., Young S.G., Reue K. 2012. 'Mouse lipin-1 and lipin-2 cooperate to maintain glycerolipid homeostasis in liver and aging cerebellum', *Proc Natl Acad Sci U S A*, **109**: 2486-95.

E

Egger, D., B. Wolk, R. Gosert, L. Bianchi, H. E. Blum, D. Moradpour, K. Bienz. 2002. 'Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex', *J Virol*, **76**: 5974-84.

El-Shamy, A., M. Sasayama, M. Nagano-Fujii, N. Sasase, S. Imoto, S. R. Kim, H. Hotta. 2007. 'Prediction of efficient virological response to pegylated interferon/ribavirin combination therapy by NS5A sequences of hepatitis C virus and anti-NS5A antibodies in pre-treatment sera', *Microbiol Immunol*, **51**: 471-82.

Enomoto, N., I. Sakuma, Y. Asahina, M. Kurosaki, T. Murakami, C. Yamamoto, Y. Ogura, N. Izumi, F. Marumo, C. Sato. 1996. 'Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection', *N Engl J Med*, **334**: 77-81.

Evans, M. J., C. M. Rice, S. P. Goff. 2004. 'Phosphorylation of hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates its protein interactions and viral RNA replication', *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**: 13038-43.

Evans, M. J., T. von Hahn, D. M. Tscherne, A. J. Syder, M. Panis, B. Wolk, T. Hatzioannou, J. A. McKeating, P. D. Bieniasz, C. M. Rice. 2007. 'Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry', *Nature*, **446**: 801-5.

F

Fagone, P., R. Sriburi, C. Ward-Chapman, M. Frank, J. Wang, C. Gunter, J. W. Brewer, S. Jackowski. 2007. 'Phospholipid biosynthesis program underlying membrane expansion during B-lymphocyte differentiation', *J Biol Chem*, **282**: 7591-605.

Ferraris, P., E. Blanchard, P. Roingeard. 2010. 'Ultrastructural and biochemical analyses of hepatitis C virus-associated host cell membranes', *J Gen Virol*, **91**: 2230-7.

Finck, B. N., M. C. Gropler, Z. Chen, T. C. Leone, M. A. Croce, T. E. Harris, J. C. Lawrence, Jr., D. P. Kelly. 2006. 'Lipin 1 is an inducible amplifier of the hepatic PGC-1 α /PPAR α regulatory pathway', *Cell Metab*, **4**: 199-210.

Fofana, I., N. Jilg, R. T. Chung, T. F. Baumert. 2014. 'Entry inhibitors and future treatment of hepatitis C', *Antiviral Res*, **104**: 136-42.

Friebe, P., R. Bartenschlager. 2002. 'Genetic analysis of sequences in the 3' nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication', *J Virol*, **76**: 5326-38.

Friesland, M., L. Mingorance, J. Chung, F. V. Chisari, P. Gastaminza. 2013. 'Sigma-1 receptor regulates early steps of viral RNA replication at the onset of hepatitis C virus infection', *J Virol*, **87**: 6377-90.

Furusyo, N., E. Ogawa, M. Sudoh, M. Murata, T. Ihara, T. Hayashi, H. Ikezaki, S. Hiramane, H. Mukae, K. Toyoda, H. Taniai, K. Okada, M. Kainuma, E. Kajiura, J. Hayashi. 2012. 'Raloxifene hydrochloride is an adjuvant antiviral treatment of postmenopausal women with chronic hepatitis C: a randomized trial', *J Hepatol*, **57**: 1186-92.

G

Gane, E. J., C. A. Stedman, R. H. Hyland, X. Ding, E. Svarovskaia, W. T. Symonds, R. G. Hindes, M. M. Berrey. 2013. 'Nucleotide polymerase inhibitor sofosbuvir plus ribavirin for hepatitis C', *N Engl J Med*, **368**: 34-44.

Gao, L., H. Aizaki, J. W. He, M. M. Lai. 2004. 'Interactions between viral nonstructural proteins and host protein hVAP-33 mediate the formation of hepatitis C virus RNA replication complex on lipid raft', *J Virol*, **78**: 3480-8.

Gastaminza, P., G. Cheng, S. Wieland, J. Zhong, W. Liao, F. V. Chisari. 2008. 'Cellular determinants of hepatitis C virus assembly, maturation, degradation, and secretion', *J Virol*, **82**: 2120-9.

Gastaminza, P., K. A. Dryden, B. Boyd, M. R. Wood, M. Law, M. Yeager, F. V. Chisari. 2010. 'Ultrastructural and biophysical characterization of hepatitis C virus particles produced in cell culture', *J Virol*, **84**: 10999-1009.

Gastaminza, P., S. B. Kapadia, F. V. Chisari. 2006. 'Differential biophysical properties of infectious intracellular and secreted hepatitis C virus particles', *J Virol*, **80**: 11074-81.

Gastaminza, P., S. M. Pitram, M. Dreux, L. B. Krasnova, C. Whitten-Bauer, J. Dong, J. Chung, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, F. V. Chisari. 2011. 'Antiviral stilbene 1,2-diamines prevent initiation of hepatitis C virus RNA replication at the outset of infection', *J Virol*, **85**: 5513-23.

Gastaminza, P., C. Whitten-Bauer, F. V. Chisari. 2010. 'Unbiased probing of the entire hepatitis C virus life cycle identifies clinical compounds that target multiple aspects of the infection', *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**: 291-6.

Gawlik, K., J. Baugh, U. Chatterji, P. J. Lim, M. D. Bobardt, P. A. Gallay. 2014. 'HCV core residues critical for infectivity are also involved in core-NS5A complex formation', *PLoS One*, **9**: e88866.

Germi, R., J. M. Crance, D. Garin, J. Guimet, H. Lortat-Jacob, R. W. Ruigrok, J. P. Zarski, E. Drouet. 2002. 'Cellular glycosaminoglycans and low density lipoprotein receptor are involved in hepatitis C virus adsorption', *J Med Virol*, **68**: 206-15.

Goffard, A., N. Callens, B. Bartosch, C. Wychowski, F. L. Cosset, C. Montpellier, J. Dubuisson. 2005. 'Role of N-linked glycans in the functions of hepatitis C virus envelope glycoproteins', *J Virol*, **79**: 8400-9.

Gomez, J., M. Martell, J. Quer, B. Cabot, J. I. Esteban. 1999. 'Hepatitis C viral quasispecies', *J Viral Hepat*, **6**: 3-16.

Gouklani, H., R. A. Bull, C. Beyer, F. Coulibaly, E. J. Gowans, H. E. Drummer, H. J. Netter, P. A. White, G. Haqshenas. 2012. 'Hepatitis C virus nonstructural protein 5B is involved in virus morphogenesis', *J Virol*, **86**: 5080-8.

Graham, F. L., J. Smiley, W. C. Russell, R. Nairn. 1977. 'Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5', *J Gen Virol*, **36**: 59-74.

Grakoui, A., D. W. McCourt, C. Wychowski, S. M. Feinstone, C. M. Rice. 1993. 'A second hepatitis C virus-encoded proteinase', *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**: 10583-7.

Griffin, S. D., L. P. Beales, D. S. Clarke, O. Worsfold, S. D. Evans, J. Jaeger, M. P. Harris, D. J. Rowlands. 2003. 'The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine', *FEBS Lett*, **535**: 34-8.

Gropler, M. C., T. E. Harris, A. M. Hall, N. E. Wolins, R. W. Gross, X. Han, Z. Chen, B. N. Finck. 2009. 'Lipin 2 is a liver-enriched phosphatidate phosphohydrolase enzyme that is dynamically regulated by fasting and obesity in mice', *J Biol Chem*, **284**: 6763-72.

H

Haid, S., T. Pietschmann, E. I. Pecheur. 2009. 'Low pH-dependent hepatitis C virus membrane fusion depends on E2 integrity, target lipid composition, and density of virus particles', *J Biol Chem*, **284**: 17657-67.

Haid, Sibylle, Christina Grethe, Michael T Dill, Markus Heim, Lars Kaderali, Thomas Pietschmann. 2013. "Isolate-dependent use of Claudins for cell entry by hepatitis C virus.", *Hepatology*, **59**: 24-34.

Halliwell, W. H. 1997. 'Cationic amphiphilic drug-induced phospholipidosis', *Toxicol Pathol*, **25**: 53-60.

Han, G. S., S. Siniossoglou, G. M. Carman. 2007. 'The cellular functions of the yeast lipin homolog PAH1p are dependent on its phosphatidate phosphatase activity', *J Biol Chem*, **282**: 37026-35.

Harris, H. J., C. Davis, J. G. Mullins, K. Hu, M. Goodall, M. J. Farquhar, C. J. Mee, K. McCaffrey, S. Young, H. Drummer, P. Balfe, J. A. McKeating. 2010. 'Claudin association with CD81 defines hepatitis C virus entry', *J Biol Chem*, **285**: 21092-102.

Harris, T. E., B. N. Finck. 2011. 'Dual function lipin proteins and glycerolipid metabolism', *Trends Endocrinol Metab*, **22**: 226-33.

Harris, T. E., T. A. Huffman, A. Chi, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, A. Kumar, J. C. Lawrence, Jr. 2007. 'Insulin controls subcellular localization and multisite phosphorylation of the phosphatidic acid phosphatase, lipin 1', *J Biol Chem*, **282**: 277-86.

Hatia, R. I., Z. Dimitrova, P. Skums, E. Y. Teo, C. G. Teo. 2015. 'Nosocomial hepatitis C virus transmission from tampering with injectable anesthetic opioids', *Hepatology*, **62**: 101-10.

He, S., B. Lin, V. Chu, Z. Hu, X. Hu, J. Xiao, A. Q. Wang, C. J. Schweitzer, Q. Li, M. Imamura, N. Hiraga, N. Southall, M. Ferrer, W. Zheng, K. Chayama, J. J. Marugan, T. J. Liang. 2015. 'Repurposing of the antihistamine chlorcyclizine and related compounds for treatment of hepatitis C virus infection', *Sci Transl Med*, **7**: 282ra49.

Henke, J. I., D. Goergen, J. Zheng, Y. Song, C. G. Schuttler, C. Fehr, C. Junemann, M. Niepmann. 2008. 'microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA', *EMBO J*, **27**: 3300-10.

Herker, E., C. Harris, C. Hernandez, A. Carpentier, K. Kaehlcke, A. R. Rosenberg, R. V. Farese, Jr., M. Ott. 2010. 'Efficient hepatitis C virus particle formation requires diacylglycerol acyltransferase-1', *Nat Med*, **16**: 1295-8.

Herker, E., M. Ott. 2011. 'Unique ties between hepatitis C virus replication and intracellular lipids', *Trends Endocrinol Metab*, **22**: 241-8.

Hijikata, M., H. Mizushima, T. Akagi, S. Mori, N. Kakiuchi, N. Kato, T. Tanaka, K. Kimura, K. Shimotohno. 1993. 'Two distinct proteinase activities required for the processing of a putative nonstructural precursor protein of hepatitis C virus', *J Virol*, **67**: 4665-75.

Hijikata, M., Y. K. Shimizu, H. Kato, A. Iwamoto, J. W. Shih, H. J. Alter, R. H. Purcell, H. Yoshikura. 1993. 'Equilibrium centrifugation studies of hepatitis C virus: evidence for circulating immune complexes', *J Virol*, **67**: 1953-8.

Hofer, H., H. C. Bankl, F. Wrba, P. Steindl-Munda, M. Peck-Radosavljevic, C. Osterreicher, C. Mueller, A. Gangl, P. Ferenci. 2002. 'Hepatocellular fat accumulation and low serum cholesterol in patients infected with HCV-3a', *Am J Gastroenterol*, **97**: 2880-5.

Hope, R. G., J. McLauchlan. 2000. 'Sequence motifs required for lipid droplet association and protein stability are unique to the hepatitis C virus core protein', *J Gen Virol*, **81**: 1913-25.

Horner, S. M., M. Gale, Jr. 2013. 'Regulation of hepatic innate immunity by hepatitis C virus', *Nat Med*, **19**: 879-88.

Hsu, S. H., B. Wang, J. Kota, J. Yu, S. Costinean, H. Kutay, L. Yu, S. Bai, K. La Perle, R. R. Chivukula, H. Mao, M. Wei, K. R. Clark, J. R. Mendell, M. A. Caligiuri, S. T. Jacob, J. T. Mendell, K. Ghoshal. 2012. 'Essential metabolic, anti-inflammatory, anti-tumorigenic functions of miR-122 in liver', *J Clin Invest*, **122**: 2871-83.

Hsu, V. W., M. Bai, J. Li. 2012. 'Getting active: protein sorting in endocytic recycling', *Nat Rev Mol Cell Biol*, **13**: 323-8.

Hu, Z., K. H. Lan, S. He, M. Swaroop, X. Hu, N. Southall, W. Zheng, T. J. Liang. 2014. 'Novel cell-based hepatitis C virus infection assay for quantitative high-throughput screening of anti-hepatitis C virus compounds', *Antimicrob Agents Chemother*, **58**: 995-1004.

Huang, H., F. Sun, D. M. Owen, W. Li, Y. Chen, M. Gale, Jr., J. Ye. 2007. 'Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins', *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**: 5848-53.

Huang, J. T., C. P. Tseng, M. H. Liao, S. C. Lu, W. Z. Yeh, N. Sakamoto, C. M. Chen, J. C. Cheng. 2013. 'Hepatitis C virus replication is modulated by the interaction of nonstructural protein NS5B and fatty acid synthase', *J Virol*, **87**: 4994-5004.

Hueging, K., M. Doepke, G. Vieyres, D. Bankwitz, A. Frentzen, J. Doerrbecker, F. Gumz, S. Haid, B. Wolk, L. Kaderali, T. Pietschmann. 2014. 'Apolipoprotein E codetermines tissue tropism of hepatitis C virus and is crucial for viral cell-to-cell transmission by contributing to a postenvelopment step of assembly', *J Virol*, **88**: 1433-46.

Huffman, T. A., I. Mothe-Satney, J. C. Lawrence, Jr. 2002. 'Insulin-stimulated phosphorylation of lipin mediated by the mammalian target of rapamycin', *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**: 1047-52.

I

Irshad, M., D. S. Mankotia, K. Irshad. 2013. 'An insight into the diagnosis and pathogenesis of hepatitis C virus infection', *World J Gastroenterol*, **19**: 7896-909.

Ishimoto, K., H. Nakamura, K. Tachibana, D. Yamasaki, A. Ota, K. Hirano, T. Tanaka, T. Hamakubo, J. Sakai, T. Kodama, T. Doi. 2009. 'Sterol-mediated regulation of human lipin 1 gene expression in hepatoblastoma cells', *J Biol Chem*, **284**: 22195-205.

J

Jackel-Cram, C., L. A. Babiuk, Q. Liu. 2007. 'Up-regulation of fatty acid synthase promoter by hepatitis C virus core protein: genotype-3a core has a stronger effect than genotype-1b core', *J Hepatol*, **46**: 999-1008.

Jacobson, I. M., G. L. Davis, H. El-Serag, F. Negro, C. Trepo. 2010. 'Prevalence and challenges of liver diseases in patients with chronic hepatitis C virus infection', *Clin Gastroenterol Hepatol*, **8**: 924-33.

Jacobson, I. M., S. C. Gordon, K. V. Kowdley, E. M. Yoshida, M. Rodriguez-Torres, M. S. Sulkowski, M. L. Shiffman, E. Lawitz, G. Everson, M. Bennett, E. Schiff, M. T. Al-Assi, G. M. Subramanian, D. An, M. Lin, J. McNally, D. Brainard, W. T. Symonds, J. G. McHutchison, K. Patel, J. Feld, S. Pianko, D. R. Nelson, Positron Study, Fusion Study. 2013. 'Sofosbuvir for hepatitis C genotype 2 or 3 in patients without treatment options', *N Engl J Med*, **368**: 1867-77.

Janssen, H. L., H. W. Reesink, E. J. Lawitz, S. Zeuzem, M. Rodriguez-Torres, K. Patel, A. J. van der Meer, A. K. Patick, A. Chen, Y. Zhou, R. Persson, B. D. King, S. Kauppinen, A. A. Levin, M. R. Hodges. 2013. 'Treatment of HCV infection by targeting microRNA', *N Engl J Med*, **368**: 1685-94.

Jhaveri, R., J. McHutchison, K. Patel, G. Qiang, A. M. Diehl. 2008. 'Specific polymorphisms in hepatitis C virus genotype 3 core protein associated with intracellular lipid accumulation', *J Infect Dis*, **197**: 283-91.

Jia, L., J. L. Betters, L. Yu. 2011. 'Niemann-pick C1-like 1 (NPC1L1) protein in intestinal and hepatic cholesterol transport', *Annu Rev Physiol*, **73**: 239-59.

Jiang, J., G. Luo. 2009. 'Apolipoprotein E but not B is required for the formation of infectious hepatitis C virus particles', *J Virol*, **83**: 12680-91.

Jirasko, V., R. Montserret, J. Y. Lee, J. Gouttenoire, D. Moradpour, F. Penin, R. Bartenschlager. 2010. 'Structural and functional studies of nonstructural protein 2 of the hepatitis C virus reveal its key role as organizer of virion assembly', *PLoS Pathog*, **6**: e1001233.

Jones, D. M., A. H. Patel, P. Targett-Adams, J. McLauchlan. 2009. 'The hepatitis C virus NS4B protein can trans-complement viral RNA replication and modulates production of infectious virus', *J Virol*, **83**: 2163-77.

Jopling, C. L. 2008. 'Regulation of hepatitis C virus by microRNA-122', *Biochem Soc Trans*, **36**: 1220-3.

Jopling, C. L., M. Yi, A. M. Lancaster, S. M. Lemon, P. Sarnow. 2005. 'Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA', *Science*, **309**: 1577-81.

K

Kanto, T., N. Hayashi, T. Takehara, H. Hagiwara, E. Mita, M. Naito, A. Kasahara, H. Fusamoto, T. Kamada. 1995. 'Density analysis of hepatitis C virus particle population in the circulation of infected hosts: implications for virus neutralization or persistence', *J Hepatol*, **22**: 440-8.

Kapadia, S. B., H. Barth, T. Baumert, J. A. McKeating, F. V. Chisari. 2007. 'Initiation of hepatitis C virus infection is dependent on cholesterol and cooperativity between CD81 and scavenger receptor B type I', *J Virol*, **81**: 374-83.

Kato, T., T. Date, M. Miyamoto, A. Furusaka, K. Tokushige, M. Mizokami, T. Wakita. 2003. 'Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon', *Gastroenterology*, **125**: 1808-17.

Kato, T., T. Date, A. Murayama, K. Morikawa, D. Akazawa, T. Wakita. 2006. 'Cell culture and infection system for hepatitis C virus', *Nat Protoc*, **1**: 2334-9.

Ke, P. Y., S. S. Chen. 2011. 'Activation of the unfolded protein response and autophagy after hepatitis C virus infection suppresses innate antiviral immunity in vitro', *J Clin Invest*, **121**: 37-56.

Kennedy, E. P., S. W. Smith, S. B. Weiss. 1956. 'New synthesis of lecithin in an isolated enzyme system', *Nature*, **178**: 594-5.

Kim, H. B., A. Kumar, L. Wang, G. H. Liu, S. R. Keller, J. C. Lawrence, Jr., B. N. Finck, T. E. Harris. 2010. 'Lipin 1 represses NFATc4 transcriptional activity in adipocytes to inhibit secretion of inflammatory factors', *Mol Cell Biol*, **30**: 3126-39.

Kohno, T., M. Tsuge, C. N. Hayes, T. Hatakeyama, M. Ohnishi, H. Abe, D. Miki, N. Hiraga, M. Imamura, S. Takahashi, H. Ochi, S. Tanaka, K. Chayama. 2012. 'Identification of novel HCV deletion mutants in chronic hepatitis C patients', *Antivir Ther*, **17**: 1551-61.

Kolykhalov, A. A., K. Mihalik, S. M. Feinstone, C. M. Rice. 2000. 'Hepatitis C virus-encoded enzymatic activities and conserved RNA elements in the 3' nontranslated region are essential for virus replication in vivo', *J Virol*, **74**: 2046-51.

Kondo, Y., T. Shimosegawa. 2013. 'Direct effects of hepatitis C virus on the lymphoid cells', *World J Gastroenterol*, **19**: 7889-95.

Kornhuber, J., P. Tripal, M. Reichel, L. Terfloeth, S. Bleich, J. Wiltfang, E. Gulbins. 2008. 'Identification of new functional inhibitors of acid sphingomyelinase using a structure-property-activity relation model', *J Med Chem*, **51**: 219-37.

L

Laemmli, U. K. 1970. 'Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4', *Nature*, **227**: 680-5.

Lanford, R. E., E. S. Hildebrandt-Eriksen, A. Petri, R. Persson, M. Lindow, M. E. Munk, S. Kauppinen, H. Orum. 2010. 'Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection', *Science*, **327**: 198-201.

Lange, C. M., I. M. Jacobson, C. M. Rice, S. Zeuzem. 2014. 'Emerging therapies for the treatment of hepatitis C', *EMBO Mol Med*, **6**: 4-15.

Lange, C. M., S. Zeuzem. 2013. 'Perspectives and challenges of interferon-free therapy for chronic hepatitis C', *J Hepatol*, **58**: 583-92.

- Lavanchy, D.** 2009. 'The global burden of hepatitis C', *Liver Int*, **29** Suppl 1: 74-81.
- Lavillette, D., B. Bartosch, D. Nourrisson, G. Verney, F. L. Cosset, F. Penin, E. I. Pecheur.** 2006. 'Hepatitis C virus glycoproteins mediate low pH-dependent membrane fusion with liposomes', *J Biol Chem*, **281**: 3909-17.
- Lavillette, D., A. W. Tarr, C. Voisset, P. Donot, B. Bartosch, C. Bain, A. H. Patel, J. Dubuisson, J. K. Ball, F. L. Cosset.** 2005. 'Characterization of host-range and cell entry properties of the major genotypes and subtypes of hepatitis C virus', *Hepatology*, **41**: 265-74.
- Law, M., T. Maruyama, J. Lewis, E. Giang, A. W. Tarr, Z. Stamataki, P. Gastaminza, F. V. Chisari, I. M. Jones, R. I. Fox, J. K. Ball, J. A. McKeating, N. M. Kneteman, D. R. Burton.** 2008. 'Broadly neutralizing antibodies protect against hepatitis C virus quasispecies challenge', *Nat Med*, **14**: 25-7.
- Lawitz, E., A. Mangia, D. Wyles, M. Rodriguez-Torres, T. Hassanein, S. C. Gordon, M. Schultz, M. N. Davis, Z. Kayali, K. R. Reddy, I. M. Jacobson, K. V. Kowdley, L. Nyberg, G. M. Subramanian, R. H. Hyland, S. Arterburn, D. Jiang, J. McNally, D. Brainard, W. T. Symonds, J. G. McHutchison, A. M. Sheikh, Z. Younossi, E. J. Gane.** 2013. 'Sofosbuvir for previously untreated chronic hepatitis C infection', *N Engl J Med*, **368**: 1878-87.
- Ledford, H.** 2011. 'Translational research: 4 ways to fix the clinical trial', *Nature*, **477**: 526-8.
- Lee, J. Y., E. G. Acosta, I. K. Stoeck, G. Long, M. S. Hiet, B. Mueller, O. T. Fackler, S. Kallis, R. Bartenschlager.** 2014. 'Apolipoprotein E likely contributes to a maturation step of infectious hepatitis C virus particles and interacts with viral envelope glycoproteins', *J Virol*, **88**: 12422-37.
- Lerat, H., H. L. Kammoun, I. Hainault, E. Merour, M. R. Higgs, C. Callens, S. M. Lemon, F. Fofelle, J. M. Pawlotsky.** 2009. 'Hepatitis C virus proteins induce lipogenesis and defective triglyceride secretion in transgenic mice', *J Biol Chem*, **284**: 33466-74.
- Li, H. C., S. Y. Lo.** 2015. 'Hepatitis C virus: Virology, diagnosis and treatment', *World J Hepatol*, **7**: 1377-89.
- Li Y, Ramirez S, Jensen S.B., Purcell R.H., Gottwein J.M., Bukh J.** 2012. 'Highly efficient full-length hepatitis C virus genotype 1 (strain TN) infectious culture system', *Proc Natl Acad Sci U S A*, **109**: 19757-62.
- Lindenbach, B. D.** 2013. 'Virion assembly and release', *Curr Top Microbiol Immunol*, **369**: 199-218.
- Lindenbach, B. D., M. J. Evans, A. J. Syder, B. Wolk, T. L. Tellinghuisen, C. C. Liu, T. Maruyama, R. O. Hynes, D. R. Burton, J. A. McKeating, C. M. Rice.** 2005. 'Complete replication of hepatitis C virus in cell culture', *Science*, **309**: 623-6.

Lindenbach, B. D., C. M. Rice. 2013. 'The ins and outs of hepatitis C virus entry and assembly', *Nat Rev Microbiol*, **11**: 688-700.

Liu, G. H., L. Gerace. 2009. 'Sumoylation regulates nuclear localization of lipin-1alpha in neuronal cells', *PLoS One*, **4**: e7031.

Lohmann, V. 2013. 'Hepatitis C virus RNA replication', *Curr Top Microbiol Immunol*, **369**: 167-98.

Lohmann, V., F. Korner, J. Koch, U. Herian, L. Theilmann, R. Bartenschlager. 1999. 'Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line', *Science*, **285**: 110-3.

Luik, P., C. Chew, J. Aittoniemi, J. Chang, P. Wentworth, Jr., R. A. Dwek, P. C. Biggin, C. Venien-Bryan, N. Zitzmann. 2009. 'The 3-dimensional structure of a hepatitis C virus p7 ion channel by electron microscopy', *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**: 12712-6.

Luna, J. M., T. K. Scheel, T. Danino, K. S. Shaw, A. Mele, J. J. Fak, E. Nishiuchi, C. N. Takacs, M. T. Catanese, Y. P. de Jong, I. M. Jacobson, C. M. Rice, R. B. Darnell. 2015. 'Hepatitis C virus RNA functionally sequesters miR-122', *Cell*, **160**: 1099-110.

M

Macdonald, A., M. Harris. 2004. 'Hepatitis C virus NS5A: tales of a promiscuous protein', *J Gen Virol*, **85**: 2485-502.

MacPherson, J. I., B. Sidders, S. Wieland, J. Zhong, P. Targett-Adams, V. Lohmann, P. Backes, O. Delpuech-Adams, F. Chisari, M. Lewis, T. Parkinson, D. L. Robertson. 2011. 'An integrated transcriptomic and meta-analysis of hepatoma cells reveals factors that influence susceptibility to HCV infection', *PLoS One*, **6**: e25584.

Madan, V., D. Paul, V. Lohmann, R. Bartenschlager. 2014. 'Inhibition of HCV replication by cyclophilin antagonists is linked to replication fitness and occurs by inhibition of membranous web formation', *Gastroenterology*, **146**: 1361-72 e1-9.

Mandard, S., M. Muller, S. Kersten. 2004. 'Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes', *Cell Mol Life Sci*, **61**: 393-416.

Manmontri, B., M. Sariahmetoglu, J. Donkor, M. Bou Khalil, M. Sundaram, Z. Yao, K. Reue, R. Lehner, D. N. Brindley. 2008. 'Glucocorticoids and cyclic AMP selectively increase hepatic lipin-1 expression, and insulin acts antagonistically', *J Lipid Res*, **49**: 1056-67.

Mannova, P., L. Beretta. 2005. 'Activation of the N-Ras-PI3K-Akt-mTOR pathway by hepatitis C virus: control of cell survival and viral replication', *J Virol*, **79**: 8742-9.

Masaki, T., S. Matsunaga, H. Takahashi, K. Nakashima, Y. Kimura, M. Ito, M. Matsuda, A. Murayama, T. Kato, H. Hirano, Y. Endo, S. M. Lemon, T. Wakita, T. Sawasaki, T. Suzuki. 2014. 'Involvement of hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation mediated by casein kinase I-alpha in infectious virus production', *J Virol*, **88**: 7541-55.

Masaki, T., R. Suzuki, K. Murakami, H. Aizaki, K. Ishii, A. Murayama, T. Date, Y. Matsuura, T. Miyamura, T. Wakita, T. Suzuki. 2008. 'Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus particles', *J Virol*, **82**: 7964-76.

Masciopinto, F., C. Giovani, S. Campagnoli, L. Galli-Stampino, P. Colombatto, M. Brunetto, T. S. Yen, M. Houghton, P. Pileri, S. Abrignani. 2004. 'Association of hepatitis C virus envelope proteins with exosomes', *Eur J Immunol*, **34**: 2834-42.

McGivern, D. R., T. Masaki, S. Williford, P. Ingravallo, Z. Feng, F. Lahser, E. Asante-Appiah, P. Neddermann, R. De Francesco, A. Y. Howe, S. M. Lemon. 2014. 'Kinetic analyses reveal potent and early blockade of hepatitis C virus assembly by NS5A inhibitors', *Gastroenterology*, **147**: 453-62 e7.

Meertens, Laurent, Claire Bertaux, Tatjana Dragic. 2006. "Hepatitis C virus entry requires a critical postinternalization step and delivery to early endosomes via clathrin-coated vesicles.", *J Virol*, **80**: 11571-8.

Menzel, N., W. Fischl, K. Hueging, D. Bankwitz, A. Frentzen, S. Haid, J. Gentzsch, L. Kaderali, R. Bartenschlager, T. Pietschmann. 2012. 'MAP-kinase regulated cytosolic phospholipase A2 activity is essential for production of infectious hepatitis C virus particles', *PLoS Pathog*, **8**: e1002829.

Merz, A., G. Long, M. S. Hiet, B. Brugger, P. Chlanda, P. Andre, F. Wieland, J. Krijnse-Locker, R. Bartenschlager. 2011. 'Biochemical and morphological properties of hepatitis C virus particles and determination of their lipidome', *J Biol Chem*, **286**: 3018-32.

Mingorance, L., M. Friesland, M. Coto-Llerena, S. Perez-del-Pulgar, L. Boix, J. M. Lopez-Oliva, J. Bruix, X. Forns, P. Gastaminza. 2014. 'Selective inhibition of hepatitis C virus infection by hydroxyzine and benztropine', *Antimicrob Agents Chemother*, **58**: 3451-60.

Miyamoto, H., H. Okamoto, K. Sato, T. Tanaka, S. Mishiro. 1992. 'Extraordinarily low density of hepatitis C virus estimated by sucrose density gradient centrifugation and the polymerase chain reaction', *J Gen Virol*, **73**: 715-8.

Miyanari, Y., K. Atsuzawa, N. Usuda, K. Watashi, T. Hishiki, M. Zayas, R. Bartenschlager, T. Wakita, M. Hijikata, K. Shimotohno. 2007. 'The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production', *Nat Cell Biol*, **9**: 1089-97.

Mohd Hanafiah, K., J. Groeger, A. D. Flaxman, S. T. Wiersma. 2013. 'Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence', *Hepatology*, **57**: 1333-42.

Monazahian, M., I. Bohme, S. Bonk, A. Koch, C. Scholz, S. Grethe, R. Thomssen. 1999. 'Low density lipoprotein receptor as a candidate receptor for hepatitis C virus', *J Med Virol*, **57**: 223-9.

Moradpour, D., C. Englert, T. Wakita, J. R. Wands. 1996. 'Characterization of cell lines allowing tightly regulated expression of hepatitis C virus core protein', *Virology*, **222**: 51-63.

Moradpour, D., M. J. Evans, R. Gosert, Z. Yuan, H. E. Blum, S. P. Goff, B. D. Lindenbach, C. M. Rice. 2004. 'Insertion of green fluorescent protein into nonstructural protein 5A allows direct visualization of functional hepatitis C virus replication complexes', *J Virol*, **78**: 7400-9.

Moradpour, D., F. Penin. 2013. 'Hepatitis C virus proteins: from structure to function', *Curr Top Microbiol Immunol*, **369**: 113-42.

Moradpour, D., F. Penin, C. M. Rice. 2007. 'Replication of hepatitis C virus', *Nat Rev Microbiol*, **5**: 453-63.

Moriishi, K., Y. Matsuura. 2012. 'Exploitation of lipid components by viral and host proteins for hepatitis C virus infection', *Front Microbiol*, **3**: 54.

Morikawa, K., J. Gouttenoire, C. Hernandez, V. L. Dao Thi, H. T. Tran, C. M. Lange, M. T. Dill, M. H. Heim, O. Donze, F. Penin, M. Quadroni, D. Moradpour. 2014. 'Quantitative proteomics identifies the membrane-associated peroxidase GPx8 as a cellular substrate of the hepatitis C virus NS3-4A protease', *Hepatology*, **59**: 423-33.

Murakami, Y., M. Fukasawa, Y. Kaneko, T. Suzuki, T. Wakita, H. Fukazawa. 2013. 'Selective estrogen receptor modulators inhibit hepatitis C virus infection at multiple steps of the virus life cycle', *Microbes Infect*, **15**: 45-55.

N

Nagy, P. D., J. Pogany. 2012. 'The dependence of viral RNA replication on co-opted host factors', *Nat Rev Microbiol*, **10**: 137-49.

Nakabayashi, H., K. Taketa, K. Miyano, T. Yamane, J. Sato. 1982. 'Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium', *Cancer Res*, **42**: 3858-63.

Neddermann, P., M. Quintavalle, C. Di Pietro, A. Clementi, M. Cerretani, S. Altamura, L. Bartholomew, R. De Francesco. 2004. 'Reduction of hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation by selective inhibition of cellular kinases activates viral RNA replication in cell culture', *J Virol*, **78**: 13306-14.

Negro, F. 2006. 'Mechanisms and significance of liver steatosis in hepatitis C virus infection', *World J Gastroenterol*, **12**: 6756-65.

Negro, F., A. J. Sanyal. 2009. 'Hepatitis C virus, steatosis and lipid abnormalities: clinical and pathogenic data', *Liver Int*, **29**: 26-37.

Nelson, P. K., B. M. Mathers, B. Cowie, H. Hagan, D. Des Jarlais, D. Horyniak, L. Degenhardt. 2011. 'Global epidemiology of hepatitis B and hepatitis C in people who inject drugs: results of systematic reviews', *Lancet*, **378**: 571-83.

Neumann, A. U., N. P. Lam, H. Dahari, D. R. Gretch, T. E. Wiley, T. J. Layden, A. S. Perelson. 1998. 'Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy', *Science*, **282**: 103-7.

Nguyen, D. L., T. R. Morgan. 2012. 'Management of Adverse Events During the Treatment of Chronic Hepatitis C Infection', *Clin Liver Dis (Hoboken)*, **1**: 54-57.

Nielsen, S. U., M. F. Bassendine, A. D. Burt, C. Martin, W. Pumeechockchai, G. L. Toms. 2006. 'Association between hepatitis C virus and very-low-density lipoprotein (VLDL)/LDL analyzed in iodixanol density gradients', *J Virol*, **80**: 2418-28.

Niepmann, M. 2013. 'Hepatitis C virus RNA translation', *Curr Top Microbiol Immunol*, **369**: 143-66.

O

Oem, J. K., C. Jackel-Cram, Y. P. Li, Y. Zhou, J. Zhong, H. Shimano, L. A. Babiuk, Q. Liu. 2008. 'Activation of sterol regulatory element-binding protein 1c and fatty acid synthase transcription by hepatitis C virus non-structural protein 2', *J Gen Virol*, **89**: 1225-30.

Ohata, K., K. Hamasaki, K. Toriyama, K. Matsumoto, A. Saeki, K. Yanagi, S. Abiru, Y. Nakagawa, M. Shigeno, S. Miyazoe, T. Ichikawa, H. Ishikawa, K. Nakao, K. Eguchi. 2003. 'Hepatic steatosis is a risk factor for hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C virus infection', *Cancer*, **97**: 3036-43.

Okuda, M., K. Li, M. R. Beard, L. A. Showalter, F. Scholle, S. M. Lemon, S. A. Weinman. 2002. 'Mitochondrial injury, oxidative stress, and antioxidant gene expression are induced by hepatitis C virus core protein', *Gastroenterology*, **122**: 366-75.

Otto, G. A., J. D. Puglisi. 2004. 'The pathway of HCV IRES-mediated translation initiation', *Cell*, **119**: 369-80.

OuYang, B., S. Xie, M. J. Berardi, X. Zhao, J. Dev, W. Yu, B. Sun, J. J. Chou. 2013. 'Unusual architecture of the p7 channel from hepatitis C virus', *Nature*, **498**: 521-5.

P

Park, C. Y., H. J. Jun, T. Wakita, J. H. Cheong, S. B. Hwang. 2009. 'Hepatitis C virus nonstructural 4B protein modulates sterol regulatory element-binding protein signaling via the AKT pathway', *J Biol Chem*, **284**: 9237-46.

Paul, D., V. Madan, R. Bartenschlager. 2014. 'Hepatitis C virus RNA replication and assembly: living on the fat of the land', *Cell Host Microbe*, **16**: 569-79.

Paul, D., I. Romero-Brey, J. Gouttenoire, S. Stoitsova, J. Krijnse-Locker, D. Moradpour, R. Bartenschlager. 2011. 'NS4B self-interaction through conserved C-terminal elements is required for the establishment of functional hepatitis C virus replication complexes', *J Virol*, **85**: 6963-76.

Pawlotsky, J. M., J. J. Feld, S. Zeuzem, J. H. Hoofnagle. 2015. 'From non-A, non-B hepatitis to hepatitis C virus cure', *J Hepatol*, **62**: S87-99.

Pedersen, I. M., G. Cheng, S. Wieland, S. Volinia, C. M. Croce, F. V. Chisari, M. David. 2007. 'Interferon modulation of cellular microRNAs as an antiviral mechanism', *Nature*, **449**: 919-22.

Penin, F., J. Dubuisson, F. A. Rey, D. Moradpour, J. M. Pawlotsky. 2004. 'Structural biology of hepatitis C virus', *Hepatology*, **39**: 5-19.

Perlemuter, G., A. Sabile, P. Letteron, G. Vona, A. Topilco, Y. Chretien, K. Koike, D. Pessayre, J. Chapman, G. Barba, C. Brechot. 2002. 'Hepatitis C virus core protein inhibits microsomal triglyceride transfer protein activity and very low density lipoprotein secretion: a model of viral-related steatosis', *FASEB J*, **16**: 185-94.

Peterfy, M., T. E. Harris, N. Fujita, K. Reue. 2010. 'Insulin-stimulated interaction with 14-3-3 promotes cytoplasmic localization of lipin-1 in adipocytes', *J Biol Chem*, **285**: 3857-64.

Peterfy, M., J. Phan, K. Reue. 2005. 'Alternatively spliced lipin isoforms exhibit distinct expression pattern, subcellular localization, and role in adipogenesis', *J Biol Chem*, **280**: 32883-9.

Peterfy, M., J. Phan, P. Xu, K. Reue. 2001. 'Lipodystrophy in the fld mouse results from mutation of a new gene encoding a nuclear protein, lipin', *Nat Genet*, **27**: 121-4.

Peterson, T. R., S. S. Sengupta, T. E. Harris, A. E. Carmack, S. A. Kang, E. Balderas, D. A. Guertin, K. L. Madden, A. E. Carpenter, B. N. Finck, D. M. Sabatini. 2011. 'mTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the SREBP pathway', *Cell*, **146**: 408-20.

Phan, T., R. K. Beran, C. Peters, I. C. Lorenz, B. D. Lindenbach. 2009. 'Hepatitis C virus NS2 protein contributes to virus particle assembly via opposing epistatic interactions with the E1-E2 glycoprotein and NS3-NS4A enzyme complexes', *J Virol*, **83**: 8379-95.

Pietschmann, T., A. Kaul, G. Koutsoudakis, A. Shavinskaya, S. Kallis, E. Steinmann, K. Abid, F. Negro, M. Dreux, F. L. Cosset, R. Bartenschlager. 2006. 'Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras', *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**: 7408-13.

Piodi, A., P. Chouteau, H. Lerat, C. Hezode, J. M. Pawlotsky. 2008. 'Morphological changes in intracellular lipid droplets induced by different hepatitis C virus genotype core sequences and relationship with steatosis', *Hepatology*, **48**: 16-27.

Ploss, A., M. J. Evans. 2012. 'Hepatitis C virus host cell entry', *Curr Opin Virol*, **2**: 14-9.

Ploss, A., M. J. Evans, V. A. Gaysinskaya, M. Panis, H. You, Y. P. de Jong, C. M. Rice. 2009. 'Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells', *Nature*, **457**: 882-6.

Polyak, S. J., S. McArdle, S. L. Liu, D. G. Sullivan, M. Chung, W. T. Hofgartner, R. L. Carithers, Jr., B. J. McMahon, J. I. Mullins, L. Corey, D. R. Gretch. 1998. 'Evolution of hepatitis C virus quasispecies in hypervariable region 1 and the putative interferon sensitivity-determining region during interferon therapy and natural infection', *J Virol*, **72**: 4288-96.

Popescu, C. I., N. Callens, D. Trinel, P. Roingeard, D. Moradpour, V. Descamps, G. Duverlie, F. Penin, L. Heliot, Y. Rouille, J. Dubuisson. 2011. 'NS2 protein of hepatitis C virus interacts with structural and non-structural proteins towards virus assembly', *PLoS Pathog*, **7**: e1001278.

Popescu, C. I., L. Riva, O. Vlaicu, R. Farhat, Y. Rouille, J. Dubuisson. 2014. 'Hepatitis C virus life cycle and lipid metabolism', *Biology (Basel)*, **3**: 892-921.

Posor, Y., M. Eichhorn-Grunig, V. Haucke. 2015. 'Phosphoinositides in endocytosis', *Biochim Biophys Acta*, **1851**: 794-804.

Pumeechockchai, W., D. Bevitt, K. Agarwal, T. Petropoulou, B. C. Langer, B. Belohradsky, M. F. Bassendine, G. L. Toms. 2002. 'Hepatitis C virus particles of different density in the blood of chronically infected immunocompetent and immunodeficient patients: Implications for virus clearance by antibody', *J Med Virol*, **68**: 335-42.

R

Racanelli, V., B. Rehmann. 2003. 'Hepatitis C virus infection: when silence is deception', *Trends Immunol*, **24**: 456-64.

Rakic, B., S. M. Sagan, M. Noestheden, S. Belanger, X. Nan, C. L. Evans, X. S. Xie, J. P. Pezacki. 2006. 'Peroxisome proliferator-activated receptor alpha antagonism inhibits hepatitis C virus replication', *Chem Biol*, **13**: 23-30.

Ramakrishnaiah, V., C. Thumann, I. Fofana, F. Habersetzer, Q. Pan, P. E. de Ruiter, R. Willemsen, J. A. Demmers, V. Stalin Raj, G. Jenster, J. Kwekkeboom, H. W. Tilanus, B. L. Haagmans, T. F. Baumert, L. J. van der Laan. 2013. 'Exosome-mediated transmission of hepatitis C virus between human hepatoma Huh7.5 cells', *Proc Natl Acad Sci U S A*, **110**: 13109-13.

Reiss, S., C. Harak, I. Romero-Brey, D. Radujkovic, R. Klein, A. Ruggieri, I. Rebhan, R. Bartenschlager, V. Lohmann. 2013. 'The lipid kinase phosphatidylinositol-4 kinase III alpha regulates the phosphorylation status of hepatitis C virus NS5A', *PLoS Pathog*, **9**: e1003359.

Reiss, S., I. Rebhan, P. Backes, I. Romero-Brey, H. Erfle, P. Matula, L. Kaderali, M. Poenisch, H. Blankenburg, M. S. Hiet, T. Longerich, S. Diehl, F. Ramirez, T. Balla, K. Rohr, A. Kaul, S. Buhler, R. Pepperkok, T. Lengauer, M. Albrecht, R. Eils, P. Schirmacher, V. Lohmann, R. Bartenschlager. 2011. 'Recruitment and activation of a lipid kinase by hepatitis C virus NS5A is essential for integrity of the membranous replication compartment', *Cell Host Microbe*, **9**: 32-45.

Ren, H., L. Federico, H. Huang, M. Sunkara, T. Drennan, M. A. Frohman, S. S. Smyth, A. J. Morris. 2010. 'A phosphatidic acid binding/nuclear localization motif determines lipin1 function in lipid metabolism and adipogenesis', *Mol Biol Cell*, **21**: 3171-81.

Reue, K., D. N. Brindley. 2008. 'Thematic Review Series: Glycerolipids. Multiple roles for lipins/phosphatidate phosphatase enzymes in lipid metabolism', *J Lipid Res*, **49**: 2493-503.

Reue, K., J. R. Dwyer. 2009. 'Lipin proteins and metabolic homeostasis', *J Lipid Res*, **50**: S109-14.

Reue, K., P. Xu, X. P. Wang, B. G. Slavin. 2000. 'Adipose tissue deficiency, glucose intolerance, increased atherosclerosis result from mutation in the mouse fatty liver dystrophy (fld) gene', *J Lipid Res*, **41**: 1067-76.

Romero-Brey, Inés, Ralf Bartenschlager. 2014. "Membranous replication factories induced by plus-strand RNA viruses.", *Viruses*, **22**: 2826-57.

Romero-Brey, Inés,reas Merz, Abhilash Chiramel, Ji-Young Lee, Petr Chlanda, Uta Haselman, Rachel Santarella-Mellwig, Anja Habermann, Simone Hoppe, Stephanie Kallis, Paul Walther, Claude Antony, Jacomine Krijnse-Locker, Ralf Bartenschlager. 2012. "Three-Dimensional Architecture and Biogenesis of Membrane Structures Associated with Hepatitis C Virus Replication.", *PLoS Pathog*, **8**: e1003056.

S

Sainz, B., Jr., N. Barretto, D. N. Martin, N. Hiraga, M. Imamura, S. Hussain, K. A. Marsh, X. Yu, K. Chayama, W. A. Alrefai, S. L. Uprichard. 2012. 'Identification of the Niemann-Pick C1-like 1 cholesterol absorption receptor as a new hepatitis C virus entry factor', *Nat Med*, **18**: 281-5.

Sakai, A., M. S. Claire, K. Faulk, S. Govindarajan, S. U. Emerson, R. H. Purcell, J. Bukh. 2003. 'The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences', *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**: 11646-51.

Scheel, T. K., C. M. Rice. 2013. 'Understanding the hepatitis C virus life cycle paves the way for highly effective therapies', *Nat Med*, **19**: 837-49.

Schneider, C. A., W. S. Rasband, K. W. Eliceiri. 2012. 'NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis', *Nat Methods*, **9**: 671-5.

Sharma, N. R., G. Mateu, M. Dreux, A. Grakoui, F. L. Cosset, G. B. Melikyan. 2011. 'Hepatitis C virus is primed by CD81 protein for low pH-dependent fusion', *J Biol Chem*, **286**: 30361-76.

Simmonds, P. 2004. 'Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus--15 years on', *J Gen Virol*, **85**: 3173-88.

Simmonds, P. 2013. 'The origin of hepatitis C virus', *Curr Top Microbiol Immunol*, **369**: 1-15.

Simons, F. E., K. J. Simons, E. M. Frith. 1984. 'The pharmacokinetics and antihistaminic of the H1 receptor antagonist hydroxyzine', *J Allergy Clin Immunol*, **73**: 69-75.

Simons, F. E., W. T. Watson, X. Y. Chen, G. Y. Minuk, K. J. Simons. 1989. 'The pharmacokinetics and pharmacodynamics of hydroxyzine in patients with primary biliary cirrhosis', *J Clin Pharmacol*, **29**: 809-15.

Sir, D., C. F. Kuo, Y. Tian, H. M. Liu, E. J. Huang, J. U. Jung, K. Machida, J. H. Ou. 2012. 'Replication of hepatitis C virus RNA on autophagosomal membranes', *J Biol Chem*, **287**: 18036-43.

Sourisseau, M., M. L. Michta, C. Zony, B. Israelow, S. E. Hopcraft, C. M. Narbus, A. Parra Martin, M. J. Evans. 2013. 'Temporal analysis of hepatitis C virus cell entry with occludin directed blocking antibodies', *PloS Pathog*, **9**: e1003244.

Staels, B., J. Dallongeville, J. Auwerx, K. Schoonjans, E. Leitersdorf, J. C. Fruchart. 1998. 'Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism', *Circulation*, **98**: 2088-93.

Steinhauer, D. A., E. Domingo, J. J. Holland. 1992. 'Lack of evidence for proofreading mechanisms associated with an RNA virus polymerase', *Gene*, **122**: 281-8.

Steinmann, E., C. Brohm, S. Kallis, R. Bartenschlager, T. Pietschmann. 2008. 'Efficient trans-encapsidation of hepatitis C virus RNAs into infectious virus-like particles', *J Virol*, **82**: 7034-46.

Stohr, S., R. Costa, L. Sandmann, S. Westhaus, S. Pfaender, Anggakusuma, E. Dazert, P. Meuleman, F. W. Vondran, M. P. Manns, E. Steinmann, T. von Hahn, S. Ciesek. 2015. 'Host cell mTORC1 is required for HCV RNA replication', *Gut*. doi:10.1136/gutjnl-2014-308971.

Su, A. I., J. P. Pezacki, L. Wodicka, A. D. Brideau, L. Supekova, R. Thimme, S. Wieland, J. Bukh, R. H. Purcell, P. G. Schultz, F. V. Chisari. 2002. 'Genomic analysis of the host response to hepatitis C virus infection', *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**: 15669-74.

Sugden, M. C., P. W. Caton, M. J. Holness. 2010. 'PPAR control: it's SIRTainly as easy as PGC', *J Endocrinol*, **204**: 93-104.

Syed, G. H., Y. Amako, A. Siddiqui. 2010. 'Hepatitis C virus hijacks host lipid metabolism', *Trends Endocrinol Metab*, **21**: 33-40.

T

Takeda, M., M. Ikeda, K. Mori, M. Yano, Y. Ariumi, H. Dansako, T. Wakita, N. Kato. 2012. 'Raloxifene inhibits hepatitis C virus infection and replication', *FEBS Open Bio*, **2**: 279-83.

Tanaka, N., K. Moriya, K. Kiyosawa, K. Koike, F. J. Gonzalez, T. Aoyama. 2008. 'PPARalpha activation is essential for HCV core protein-induced hepatic steatosis and hepatocellular carcinoma in mice', *J Clin Invest*, **118**: 683-94.

Tange, Y., A. Hirata, O. Niwa. 2002. 'An evolutionarily conserved fission yeast protein, Ned1, implicated in normal nuclear morphology and chromosome stability, interacts with Dis3, Pim1/RCC1 and an essential nucleoporin', *J Cell Sci*, **115**: 4375-85.

Teissier, E., G. Zandomenighi, A. Loquet, D. Lavillette, J. P. Lavergne, R. Montserret, F. L. Cosset, A. Bockmann, B. H. Meier, F. Penin, E. I. Pecheur. 2011. 'Mechanism of inhibition of enveloped virus membrane fusion by the antiviral drug arbidol', *PLoS One*, **6**: e15874.

Tellinghuisen, T. L., K. L. Foss, J. Treadaway. 2008. 'Regulation of hepatitis C virion production via phosphorylation of the NS5A protein', *PLoS Pathog*, **4**: e1000032.

Thiel, V., J. Herold, B. Schelle, S. G. Siddell. 2001. 'Viral replicase gene products suffice for coronavirus discontinuous transcription', *J Virol*, **75**: 6676-81.

Thomssen, R., S. Bonk, C. Propfe, K. H. Heermann, H. G. Kochel, A. Uy. 1992. 'Association of hepatitis C virus in human sera with beta-lipoprotein', *Med Microbiol Immunol*, **181**: 293-300.

Thomssen, R., S. Bonk, A. Thiele. 1993. 'Density heterogeneities of hepatitis C virus in human sera due to the binding of beta-lipoproteins and immunoglobulins', *Med Microbiol Immunol*, **182**: 329-34.

Timpe, J. M., Z. Stamataki, A. Jennings, K. Hu, M. J. Farquhar, H. J. Harris, A. Schwarz, I. Desombere, G. L. Roels, P. Balfe, J. A. McKeating. 2008. 'Hepatitis C virus cell-cell transmission in hepatoma cells in the presence of neutralizing antibodies', *Hepatology*, **47**: 17-24.

Trestard, A., Y. Bacq, L. Buzelay, F. Dubois, F. Barin, A. Goudeau, P. Roingeard. 1998. 'Ultrastructural and physicochemical characterization of the hepatitis C virus recovered from the serum of an agammaglobulinemic patient', *Arch Virol*, **143**: 2241-5.

Tsai, W. C., S. D. Hsu, C. S. Hsu, T. C. Lai, S. J. Chen, R. Shen, Y. Huang, H. C. Chen, C. H. Lee, T. F. Tsai, M. T. Hsu, J. C. Wu, H. D. Huang, M. S. Shiao, M. Hsiao, A. P. Tsou. 2012. 'MicroRNA-122 plays a critical role in liver homeostasis and hepatocarcinogenesis', *J Clin Invest*, **122**: 2884-97.

Tscherne, D. M., C. T. Jones, M. J. Evans, B. D. Lindenbach, J. A. McKeating, C. M. Rice. 2006. 'Time- and temperature-dependent activation of hepatitis C virus for low-pH-triggered entry', *J Virol*, **80**: 1734-41.

Tsutsumi, T., T. Suzuki, T. Shimoike, R. Suzuki, K. Moriya, Y. Shintani, H. Fujie, Y. Matsuura, K. Koike, T. Miyamura. 2002. 'Interaction of hepatitis C virus core protein with retinoid X receptor alpha modulates its transcriptional activity', *Hepatology*, **35**: 937-46.

V

Valenti, L., B. M. Motta, A. Alisi, R. Sartorelli, G. Buonaiuto, P. Dongiovanni, R. Rametta, S. Pelusi, S. Fargion, V. Nobili. 2012. 'LPIN1 rs13412852 polymorphism in pediatric nonalcoholic fatty liver disease', *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, **54**: 588-93.

Vasallo, C., P. Gastaminza. 2015. 'Cellular stress responses in hepatitis C virus infection: Mastering a two-edged sword', *Virus Res.* doi: 10.1015/j.virusres.2015.03.013.

Vercauteren, K., R. J. Brown, A. A. Mesalam, J. Doerrbecker, S. Bhuj, R. Geffers, N. Van Den Eede, C. P. McClure, F. Troise, L. Verhoye, T. Baumert, A. Farhoudi, R. Cortese, J. K. Ball, G. Leroux-Roels, T. Pietschmann, A. Nicosia, P. Meuleman. 2015. 'Targeting a host-cell entry factor barricades antiviral-resistant HCV variants from on-therapy breakthrough in human-liver mice', *Gut*. doi: 10.1136/gutjnl-2014-309045

Vieyres, G., J. Dubuisson, T. Pietschmann. 2014. 'Incorporation of hepatitis C virus E1 and E2 glycoproteins: the keystones on a peculiar virion', *Viruses*, **6**: 1149-87.

Vistica, D. T., P. Skehan, D. Scudiero, A. Monks, A. Pittman, M. R. Boyd. 1991. 'Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production', *Cancer Res*, **51**: 2515-20.

Voisset, C., M. Lavie, F. Helle, A. Op De Beeck, A. Bilheu, J. Bertrand-Michel, F. Terce, L. Cocquerel, C. Wychowski, N. Vu-Dac, J. Dubuisson. 2008. 'Ceramide enrichment of the plasma membrane induces CD81 internalization and inhibits hepatitis C virus entry', *Cell Microbiol*, **10**: 606-17.

W

Wakita, T., T. Pietschmann, T. Kato, T. Date, M. Miyamoto, Z. Zhao, K. Murthy, A. Habermann, H. G. Krausslich, M. Mizokami, R. Bartenschlager, T. J. Liang. 2005. 'Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome', *Nat Med*, **11**: 791-6.

Wang, H., J. W. Perry, A. S. Luring, P. Neddermann, R. De Francesco, A. W. Tai. 2014. 'Oxysterol-binding protein is a phosphatidylinositol 4-kinase effector required for HCV replication membrane integrity and cholesterol trafficking', *Gastroenterology*, **146**: 1373-85 e1-11.

Wang, H., J. Zhang, W. Qiu, G. S. Han, G. M. Carman, K. Adeli. 2011. 'Lipin-1gamma isoform is a novel lipid droplet-associated protein highly expressed in the brain', *FEBS Lett*, **585**: 1979-84.

Wang, L. H., K. G. Rothberg, R. G. Anderson. 1993. 'Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation', *J Cell Biol*, **123**: 1107-17.

Wang, T., R. V. Campbell, M. K. Yi, S. M. Lemon, S. A. Weinman. 2010. 'Role of Hepatitis C virus core protein in viral-induced mitochondrial dysfunction', *J Viral Hepat*, **17**: 784-93.

Waris, G., D. J. Felmlee, F. Negro, A. Siddiqui. 2007. 'Hepatitis C virus induces proteolytic cleavage of sterol regulatory element binding proteins and stimulates their phosphorylation via oxidative stress', *J Virol*, **81**: 8122-30.

Watashi, K., D. Inoue, M. Hijikata, K. Goto, H. H. Aly, K. Shimotohno. 2007. 'Anti-hepatitis C virus activity of tamoxifen reveals the functional association of estrogen receptor with viral RNA polymerase NS5B', *J Biol Chem*, **282**: 32765-72.

Watashi, K., N. Ishii, M. Hijikata, D. Inoue, T. Murata, Y. Miyanari, K. Shimotohno. 2005. 'Cyclophilin B is a functional regulator of hepatitis C virus RNA polymerase', *Mol Cell*, **19**: 111-22.

Watson, J. P., D. J. Bevitt, G. P. Spickett, G. L. Toms, M. F. Bassendine. 1996. 'Hepatitis C virus density heterogeneity and viral titre in acute and chronic infection: a comparison of immunodeficient and immunocompetent patients', *J Hepatol*, **25**: 599-607.

Wigler, M., A. Pellicer, S. Silverstein, R. Axel, G. Urlaub, L. Chasin. 1979. 'DNA-mediated transfer of the adenine phosphoribosyltransferase locus into mammalian cells', *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**: 1373-6.

Wolk, B., D. Sansonno, H. G. Krausslich, F. Dammacco, C. M. Rice, H. E. Blum, D. Moradpour. 2000. 'Subcellular localization, stability, and trans-cleavage competence of the hepatitis C virus NS3-NS4A complex expressed in tetracycline-regulated cell lines', *J Virol*, **74**: 2293-304.

Woodhouse, S. D., R. Narayan, S. Latham, S. Lee, R. Antrobus, B. Gangadharan, S. Luo, G. P. Schroth, P. Klenerman, N. Zitzmann. 2010. 'Transcriptome sequencing, microarray, and proteomic analyses reveal cellular and metabolic impact of hepatitis C virus infection in vitro', *Hepatology*, **52**: 443-53.

Wozniak, A. L., S. Griffin, D. Rowlands, M. Harris, M. Yi, S. M. Lemon, S. A. Weinman. 2010. 'Intracellular proton conductance of the hepatitis C virus p7 protein and its contribution to infectious virus production', *PLoS Pathog*, **6**: e1001087.

Y

Yamane, D., D. R. McGivern, T. Masaki, S. M. Lemon. 2013. 'Liver injury and disease pathogenesis in chronic hepatitis C', *Curr Top Microbiol Immunol*, **369**: 263-88.

Yanagi, M., M. St Claire, S. U. Emerson, R. H. Purcell, J. Bukh. 1999. 'In vivo analysis of the 3' untranslated region of the hepatitis C virus after in vitro mutagenesis of an infectious cDNA clone', *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**: 2291-5.

Yang, F., J. M. Robotham, H. B. Nelson, A. Irsigler, R. Kenworthy, H. Tang. 2008. 'Cyclophilin A is an essential cofactor for hepatitis C virus infection and the principal mediator of cyclosporine resistance in vitro', *J Virol*, **82**: 5269-78.

Yi, M., S. M. Lemon. 2003. '3' nontranslated RNA signals required for replication of hepatitis C virus RNA', *J Virol*, **77**: 3557-68.

Yoon, M. S., Y. Sun, E. Arauz, Y. Jiang, J. Chen. 2011. 'Phosphatidic acid activates mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) kinase by displacing FK506 binding protein 38 (FKBP38) and exerting an allosteric effect', *J Biol Chem*, **286**: 29568-74.

Yu, Ming-Lung, Brendan Jacka, Francois Lamoury, Peter Simmonds, Gregory J. Dore, Jason Grebely, Tanya Applegate. 2013. 'Sequencing of the Hepatitis C Virus: A Systematic Review', *PLoS One*, **8**: e67073.

Z

Zahid, M. N., M. Turek, F. Xiao, V. L. Thi, M. Guerin, I. Fofana, P. Bachellier, J. Thompson, L. Delang, J. Neyts, D. Bankwitz, T. Pietschmann, M. Dreux, F. L. Cosset, F. Grunert, T. F. Baumert, M. B. Zeisel. 2013. 'The postbinding activity of scavenger receptor class B type I mediates initiation of hepatitis C virus infection and viral dissemination', *Hepatology*, **57**: 492-504.

Zeisel, M. B., J. Lupberger, I. Fofana, T. F. Baumert. 2013. 'Host-targeting agents for prevention and treatment of chronic hepatitis C - perspectives and challenges', *J Hepatol*, **58**: 375-84.

Zeuzem, S., G. M. Dusheiko, R. Salupere, A. Mangia, R. Flisiak, R. H. Hyland, A. Illeperuma, E. Svarovskaia, D. M. Brainard, W. T. Symonds, G. M. Subramanian, J. G. McHutchison, O. Weiland, H. W. Reesink, P. Ferenci, C. Hezode, R. Esteban, Valence Investigators. 2014. 'Sofosbuvir and ribavirin in HCV genotypes 2 and 3', *N Engl J Med*, **370**: 1993-2001.

Zhang, P., L. O'Loughlin, D. N. Brindley, K. Reue. 2008. 'Regulation of lipin-1 gene expression by glucocorticoids during adipogenesis', *J Lipid Res*, **49**: 1519-28.

Zhang, P., M. A. Verity, K. Reue. 2014. 'Lipin-1 regulates autophagy clearance and intersects with statin drug effects in skeletal muscle', *Cell Metab*, **20**: 267-79.

Zhong, J., P. Gastaminza, G. Cheng, S. Kapadia, T. Kato, D. R. Burton, S. F. Wieland, S. L. Uprichard, T. Wakita, F. V. Chisari. 2005. 'Robust hepatitis C virus infection in vitro', *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**: 9294-9.

Zhong, J., P. Gastaminza, J. Chung, Z. Stamataki, M. Isogawa, G. Cheng, J. A. McKeating, F. V. Chisari. 2006. 'Persistent hepatitis C virus infection in vitro: coevolution of virus and host', *J Virol*, **80**: 11082-93.

12. ANEXOS
